

11-15430
00-00141
8-01

발간등록번호
11-1543000-001418-01

국내산 식
용 백장미
로부터
피부 미용
기능성을
갖는
이너뷰티
(Inner
Beauty)
소재 개발
및 제품화

최
종
보
고
서

2016

농림축산식품부

고
부
가
가
치
식
품
기
술
개
발
사
업
R
&
D
R
e
p
o
r
t

국내산 식용 백장미로부터
피부 미용 기능성을 갖는
이너뷰티(Inner Beauty)
소재 개발 및 제품화

최종보고서

2016. 10. 27.

주관연구기관 / (주)정식품
협동연구기관 / 충북대학교
산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 식용 백장미로부터 피부미용 기능성을 갖는 이너뷰티(Inner Beauty)소재 개발 및 제품화”(개발기간 : 2013.07.16 ~ 2016.07.15)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016 . 10. 26.

주관연구기관명 : (주) 정식품	대표이사 이순구 (인)
제1협동연구기관명 : 충북대학교 식품공학과	산학협력단장 우수동 (인)
제2협동연구기관명 : 충북대학교 수의학과	산학협력단장 우수동 (인)

주관연구책임자 : 이윤복
제1협동연구책임자 : 한남수
제2협동연구책임자 : 김윤배

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< Contents >

Chapter 1. Overview of the research and development projects	1
Section 1. Purpose of research and development	1
Section 2. Necessity of research and development	1
Section 3. Range of research and development	9
Chapter 2. The current Research status	11
Section 1. Patent trend of skin-functional food, beverage, extracts	11
Section 2. The current Research status of inner beauty food	14
Section 3. Research and Development Performance and Meaning	15
Chapter 3. Results and Contents of Research and Development	17
Section 1. Development of extraction technology for skin care functional components from white rose petal	17
Section 2. Establishment and optimization of extraction method and condition	21
Section 3. Separation and identification of white rose petal components, selection of marker compound	31
Section 4. Assessment of skin care function by white rose extracts	78
Section 5. Development of technology for enhanced microorganism functional component using white rose extracts and Effects of white rose extracts to intestinal microorganism	136
Section 6. Optimization of extraction technology and development of mass production technology for skin care functional components from white rose petal	159
Section 7. Development of functional food included function for improvement skin moisturizing, wrinkle and atopy	174
Section 8. Development of High value added functional wine	212
Section 9. Overall analysis and Consideration	224
Chapter 4. Achievements of Research and Contribution to the Achievements in the related Fields	233
Section 1. Achievements of Research	233
Section 2. Level of contribution in the related Fields	236
Chapter 5. Development and the applicable planning	238

Chapter 6. Collected foreign scientific technology information for studying	239
Chapter 7. Security level of Research and Development Performance	241
Chapter 8. To register research installation and present condition of equipment at National science and technology information system	242
Chapter 9. Implementation Performance of Safety Managements of Laboratory	243
Section 1. Supervision research organization(Dr.Chung's food)	243
Section 2. First and second cooperate organization(Chungbuk Univ. Food Engineering, Chungbuk Univ. Verterinary Medicine)	244
Chapter 10. Representative result of Research and Development projects	248
Section 1. Patent/Industry property results	248
Section 2. Thesis results	248
Section 3. Symposium presentation results	251
Section 4. Reward results	252
Section 5. Promotion results	253
Section 6. Workforce results	253
Chapter 11. Other details	254
Chapter 12. References	255

〈 목 차 〉

제1장 연구개발과제의개요	1
1절 연구개발의 목적	1
2절 연구개발의 필요성	1
3절 연구개발 범위	9
제2장 국내외 기술개발 현황	11
1절 피부기능성 식품/음료/추출물 관련 특허 동향	11
2절 이너뷰티 식품 시장 현황	14
3절 연구과제 기술개발의 성과 및 의의	15
제3장 연구수행 내용 및 결과	17
1절 백장미로부터 피부미용 기능성 성분의 추출 기술 개발	17
2절 추출방법 선정/추출조건 확립 및 최적화	21
3절 백장미 추출물의 성분 분리 동정 및 지표물질 선정	31
4절 백장미 추출물을 이용한 피부 미용 기능성 평가	78
5절 백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발과 장내 미생물에 미치는 영향	136
6절 백장미로부터 피부 미용 기능성 성분 추출공정 최적화 및 대량 생산 기술개발	159
7절 이너뷰티(Inner Beauty) 기능성 식품개발	174
8절 고부가가치 와인 개발	212
9절 결과종합 분석 및 고찰	224
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	233
1절 목표달성도	233
2절 관련분야 기여도	236
제5장 연구결과의 활용계획 등	238
제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	239
제7장 연구개발성과의 보안등급	241
제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	242
제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	243
1절 주관연구기관(정식품)	243
2절 제1.2협동기관(충북대 식품공학과, 충북대 수의학과)	244
제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	248
1절 특허/산업재산권 실적	248
2절 논문실적	248

3절 학술대회발표 실적	251
4절 수상 실적	252
5절 홍보 실적	253
6절 인력 양성	253
제11장 기타사항	254
제12장 참고문헌	255

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품 기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

제1장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

1절 연구개발의 목적

1. 백장미 기능성분의 추출 기술 개발
2. 백장미 추출물의 성분 동정 및 지표 물질 선정
3. 백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발
4. 백장미 추출물을 이용한 피부 미용 기능성 확인
5. 백장미 추출물의 장내 미생물에 미치는 영향 및 이를 이용한 고부가가치 와인 개발
6. 피부보습, 주름개선 및 아토피성 피부 완화 기능성 성분이 함유된 이너뷰티 (Inner Beauty) 기능성 식품 개발

2절 연구개발의 필요성

1. 사회/문화적 측면

가. 사회/문화적 배경

- (1) 건강한 피부를 원하는 욕구증가와 외모가 사회, 경제활동의 중요한 변수로 작용하면서 여성뿐만 아니라 남자도 피부건강에 많은 관심을 갖고 있으며, 사회·문화적 관심이 증대됨에 따라 기능성 화장품에 이어 고기능성 이너뷰티(Inner Beauty)식품에 대한 수요가 확대되고 또한 피부질환 대상인구의 증가와 막대한 의료비용의 지출로 관련 제품의 출시가 증가하는 트렌드를 보이고 있음. 장미는 피부미용을 대표하는 식물로서 이너뷰티(Inner Beauty)소재로 연구개발과 제품화에 적합한 사회·문화적 배경을 갖고 있음.

나. 피부건강에 대한 사회적 관심 증가

- (1) 소득이 증가할수록 인간은 건강하고 아름다운 피부를 유지하고 싶은 본능적인 욕망은 모든 사람이 가지고 있으며, 최근 젊고 건강한 피부는 인간의 사회, 경제활동에 중요한 변수로 작용하기 시작하여 피부보습 및 미용에 많은 비용을 지출하고 있음.
- (2) 또한 피부 관리에 대한 사회적 시각이 달라지면서 여성은 물론 남성도 피부관리가 요구되는 사회적 환경이 조성되어 신체 내적인 건강뿐만 아니라 외적인 아름다움 대한 기대와 욕구가 증가하고 이러한 사회적 현상에 따라 남성 피부미용 제품의 개발이 다양하게 진행되고 있으며, 화장품 산업에서의 점유율이 매년 증가하고 있음.

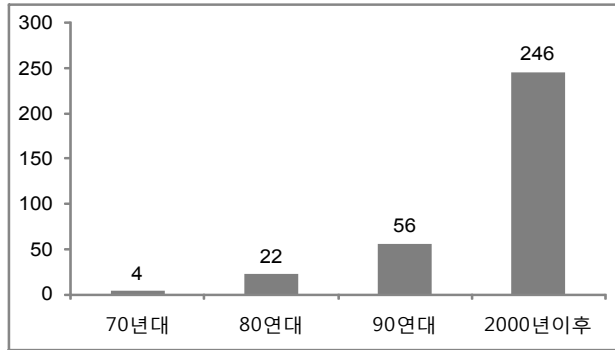


그림1. 1970년대부터 2000년 이후 남성화장품 상표출원 현황[자료=특허청]

- (3) 중년 여성들의 광범위한 사회진출로 중년층 여성들의 피부노화 방지에 대한 관심이 사회적으로 큰 이슈가 되고, 최근에는 피부노화 방지를 예방 해주는 화장품, 건강식품, 그리고 다양한 피부관리 요법들이 나오고 있음.

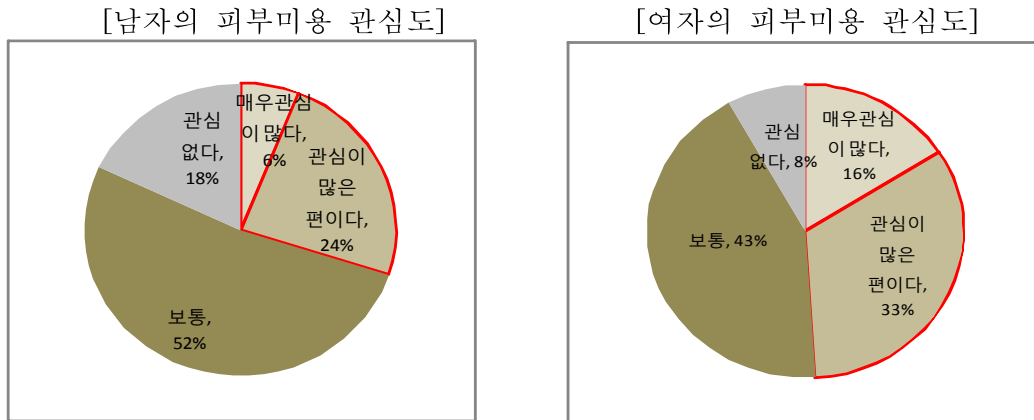


그림2. 성별에 따른 피부미용 관심도 조사

다. 피부기능성 이너뷰티(Inner Beauty)식품에 대한 욕구 증가

- (1) 피부관련 의약품 중 스테로이드제등의 합성품은 피부질환의 치료를 가장 빠르게 해주는 약이지만, 장기 사용으로 내성이 생기면 효과가 줄어들 뿐 아니라 스테로이드 부작용으로 성장기 어린이의 성장 억제, 노화촉진, 심장병, 간 손상, 성 기관 이상 등의 가능성이 있다고 보고.
- (2) 피부 미용에 대한 사회적인식과 관심이 증가한 만큼 의약품에 비해 안전하고 지속적으로 사용할 수 있는 천연기능성 이너뷰티(Inner Beauty)소재와 식품 보조제에 대한 수요가 증가.
- (3) 미용식품은 이너 뷰티의 개념으로 건강기능식품의 한 축을 이루고 있으며 개별인정형과 고시형을 합쳐 현재 14개 식품 소재가 피부 관련 기능성을 표시하고 있으며 2011년 이후 지속적으로 기능성 소재가 증가하고 있음.

(가) 피부 건강 기능성 허가 내용

- ① 햇볕 또는 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강을 유지하는데 도움을 줄

수 있음

② 피부보습에 도움을 줄 수 있음

라. 피부질환 대상인구의 증가

- (1) 경제수준이 높아지고 사회가 노령화될수록 피부에 대한 관심이 증가되며, 노인성 피부 질환을 비롯한 각종 피부질환의 빈도가 더욱 증가하고 있는 추세.
- (2) 의학의 발달과 경제발전, 그리고 의식구조의 변화 및 가족계획사업 등에 의한 출생률의 저하와 평균수명의 연장은, 연소연령층 인구의 감소와 함께 상대적으로 고령층 인구를 증가시키고 있으며, 2008년 통계청 자료에 따르면 우리나라의 65세 이상 노인인구는 전체 인구의 11 %가 통계청의 미래인구통계치를 바탕으로 보면 40년 뒤에는 40 %에 육박할 것으로 예상.
- (3) 노인들의 피부는 노화로 인하여 피부층이 얇아지고 피하지방도 적어지며, 주름이 생김과 동시에 각질층 수분함량의 저하가 일어나 65세 이상 노인의 80 % 이상에서 노인성 건조증이 발생하며 피부에 가려움증을 느끼고 각종 습진의 발생이 증가.
- (4) 환경노출에 의한 피부질환은 아동뿐만 아니라 성인에게서도 많이 나타나고 있는 추세이며, 현재 100 만 명 정도로 집계되고 있고 진료비는 900 억 원 이상을 기록하고 있음. 30세 미만의 환자가 76.8 %로 대다수를 차지하고 있음.

마. 연간 건조피부로 인한 피부질환 의료비 지출의 증가

- (1) 건조피부와 연관된 피부 질환은 피부염, 건피증, 만성습진 등이 대표적이며, 전신질환으로는 만성신부전증, 당뇨병 환자들에게서 건조피부가 자주 발생.
- (2) 국내 피부질환의 발생빈도는 전체 질환 군중 5위를 차지하고 있을 정도로 매우 흔하며, 피부질환 치료비로 사용되는 의료비는 전체 의료비 중 상당한 부분을 차지하고 있다. 이너뷰티(Inner Beauty)식품 및 기능성 화장품 시장의 규모까지 계산하면 전체 인구가 피부를 위하여 사용하는 비용은 천문학적 수준
- (3) 대한피부과학회 조사에 따르면 국내 피부염 환자는 질환 치료를 위한 직간접 비용으로 연간 415 만 3440 원을 지출하는 것으로 확인되었으며, 치료를 위한 직접비는 264 만원, 간접비는 150 만원 정도였으며, 국내 유병률을 고려하면 한 해 동안 1조원 정도의 사회비용이 지출될 것으로 학회 측은 추산

바. 장미의 피부 기능성에 대한 높은 사회적 인식

- (1) 장미성분의 특별한 효능 때문에 고대부터 장미는 여성의 아름다움을 위해 사용되어 왔으며, 로마 귀족 여자들은 장미꽃을 찹질 약으로 사용하면 주름을 없애준다고 믿었으며, 거의 화폐로 사용 하다가피 했고 장미용액이 취기를 없애줄 것이라는 생각에 포도주를 마실 때 잔에 띄우기도 했음. 또한 장미는 미용을 위해 식용으로도 사용되었으며, 전통음식 중에 노란장미화전, 꽃가루와 꿀을 버무려 만든 다식이 있음.
- (2) 현대에도 장미는 아름다움을 대표하는 꽃으로 꽃잎부터 열매까지 비타민 A, B, C, E, 니코틴산, 유기산, 탄닌 등 다양한 비타민 군이 함유되어 장미꽃 잎은 수렴과 보습, 진정, 피부회복과 장미 에센셜 오일은 피부를 맑게 해주며 긴장을 완화시켜 심리적 안정에 도움을 준다고 알려져 있음.

2. 경제/산업적 측면

가. 경제/산업적 배경

(1) 세계적으로 이너뷰티 시장의 빠른 성장세를 보이고 국내에서도 3,000억원의 시장을 형성할 것으로 예측되며, 피부기능성 소재를 활용할 수 있는 의약품 및 메디컬 화장품 시장도 지속적으로 증가하고 있으나 사용되는 대부분의 소재는 해외에서 수입되고 있어 국산화가 시급한 실정. 장미 재배 환경이 어려워지는 가운데 화훼농업 부산물의 활용과 부가가치 확대를 통한 농업의 소득 증대와 장미 생산품의 특화를 위한 피부기능성 소재의 연구개발과 제품화가 필요

나. 피부기능성 이너뷰티(Inner Beauty)식품의 매출증가와 시장 확대

- (1) 이너 뷰티(inner beauty) 시장이 급성장하고 있으며 시판되는 이너 뷰티 상품군 가운데 대표적인 보충제들이 매년 13 ~ 15 % 성장세를 보이고 2009년 50억인 이너뷰티 시장이 올해에는 3,000 억 원 규모로 성장할 것으로 예측하고 있으며 다양한 이너뷰티 푸드가 많은 일본의 경우 시장 규모가 1조5,000 억 원에 달해 한국 시장의 성장 잠재력도 기대하고 있음.
- (2) 세계적으로 2015년 기준 약 21억 달러의 시장규모로 성장할 것으로 예상되며, 2008 ~ 2015년까지 연평균 성장률 15.14 %의 상대적으로 고성장 시장을 구성할 것으로 예상.

다. 피부기능성 소재 활용 분야의 시장 성장

- (1) 건조피부와 연관이 있는 피부 질환의 관련 국내시장 규모는 2005년 5000억원 대에 이르는 것으로 추정되며, 특히 10년 사이에 고속 성장한 피부케어 제품 시장은 연 400억 원 규모로 연평균 15 ~ 20 % 정도 성장.
- (2) 2010년 피부관련 메디컬 화장품 전체 시장규모는 36억 달러 추정되며 지속적으로 증가.

표1. 2002-2010년 Medicated skin care 제품별 시장 판매 전망 (단위:US\$ 백만)

구분	영문표기	2005	2006	2007	2008	2009	2010
전체	Medicated skin care	3309	3406	3488	3545	3613	3674
여드름 관리 치료제	Acne treatments	559	605	647	680	712	742
피부연화, 보습치료제	Moisturisers	196	202	207	212	216	222
입술 보호 치료제	Lip care	227	236	244	250	257	263
약용 샴푸	Medicated shampoos	223	227	231	233	230	226
탈모 관리 제품	Hair loss	114	108	105	104	105	107

라. 수입산 기능성소재의 대체를 통한 기능성 원료의 국산화 필요성 증가

(1) 국내에서 판매되고 있는 기능성 식품의 원료는 70 % 이상이 다국적 기업에서 수입해 단순 조합한 상품인 것으로 알려져 있으며, 건강기능식품 원료의 국산화율은 2004년에는 56 %에 이르렀으나, 2005년에는 35 %로 낮아졌고, 2011년에는 29 % 수준에 그쳤음. 피부기능성 소재의 경우에도 일본, 미국산 원료가 대부분을 차지하고 있고 이너뷰

티(Inner Beauty)식품의 매출증가를 비추어 봤을 때 앞으로 원료의 해외 의존도는 더 높아질 것으로 예상되며, 국가 경제 안정화를 위해서는 국내 자원과 국내 생산 업체를 활용한 국산 기능성 원료의 개발을 통한 내수 경제 활성화가 필요함.

(가) 건강기능식품 수입 현황

- ① 건강기능식품 수입 건수는 2005년 5816건, 2006년 7006건, 2007년 7223건으로 꾸준히 증가하여 3년간 24.2 %나 증가됨
- ② 2008년 이전 3년간 수입된 건강기능식품은 모두 2만45건이고 주로 미국 일본 등 의료 선진국에서 수입되었음
- ③ 수입 품목의 종류는 비타민류 54.8 %, EPA 또는 DHA 제품이 8.8 %, 글루코사민(7.3 %), 알로에(5.2 %), 클로렐라(4.0 %), 감마리놀렌산(3.9 %), 화분 제품(3.5 %), 효모 제품(2.9 %), 프로폴리스 추출물 제품(2.7 %), 로열젤리 제품(2.4 %), 스피루리나 제품(2.3 %), 유산균 함유 제품(2.2 %)의 순임

마. 화훼농업 부산물의 활용 및 부가가치 확대를 통한 농업의 소득 증대 필요

- (1) 국내 시즌별 수요 집중과 중국산 수입으로 인한 장미 가격의 불안정 및 기름 값의 상승, 로열티 지급 등으로 인하여 재배 환경이 어려워지는 가운데 가지치기를 한 후 버려지는 장미와 시들거나 훼손되어 관상용으로 판매가 불가능한 장미를 재활용하여 고부가 가치 식품의 원료로 이용할 경우 경제적 가치를 재고 할 수 있으며, 이를 통해 화훼 농업의 소득 증대와 농촌경제 활성화에 기여할 것으로 예상.
- (2) 또한 생물자원을 활용하여 발생하는 이익에 대하여 공유하기 위한 지침인 나고야 의정서가 발효될 경우 해외 원료 및 자원을 이용한 식품에 대한 이익을 공유해야 하고 이를 통한 기업, 농가, 국가의 손해가 막대할 것으로 예측되는 가운데, 이를 대비하기 위해 국내산 장미의 활용과 고부가가치화 및 산업화가 필요.

바. 지역(충청북도 진천군) 장미 생산품의 특화 필요성

- (1) 진천군의 화훼 농가는 1989년 진천군 이월면 삼용리 40,000㎡의 터에 장미를 심은 이래 화훼 농가의 주요 소득원으로 자리를 잡아 가고 있으며, 진천군은 중부권 최대의 장미 생산지로 총 생산량은 164만 9000속이고 2001년 1개 농가가 처음 해외로 장미를 수출하기 시작하였고, 장미 수출작목반은 한국 장미의 최대 수출 시장인 일본에 물량의 90% 이상을 수출하고 있고, 시장의 다변화를 위하여 2008년부터 러시아에도 수출 있음.
- (2) 진천군은 2002년부터 2004년까지 3년에 걸쳐 장미 무농약 재배 연구 실증 시험 재배 끝에 2004년 10월 국내에서는 처음으로 장미 무농약 친환경 인증을 획득하여 식용 장미로의 활용이 가능하게 되었으나 사업화 및 제품화 미진함.

3. 기술적 측면

가. 기술적 배경

- (1) 피부 기능성 이너뷰티 소재는 각질층에만 효능을 보이는 화장품과 달리 표피층 전체와, 진피층의 피부 조직에 작용하여 보습, 주름개선 및 미백효과를 나타낼 수 있음. 선

행 연구에서 백장미 꽃잎 추출물은 기존의 피부 기능성 소재(콜라겐, 히알루론산, 글루코실세라마이드)에 비해 다양한 피부기능성을 보였고, 이런 유효한 결과는 피부기능성 소재 후보 물질로 개발이 가능할 것으로 기대되며, 이를 위해 기능성 성분의 추출 기술, 분석기술 및 분리 동정 기술, 피부미용 기능성분 강화 생물전환기술, 이너뷰티 (Inner Beauty) 기능성 음료 개발 및 시제품 생산 기술, 피부건강 고부가가치 와인 생산 기술개발 필요.

나. 피부 기능성 이너뷰티(Inner Beauty)소재 개발 필요성

- (1) 건강한 피부를 유지하기 위해서는 화장품과 같이 유효성분을 인체 외부에서 공급해야 할 뿐 아니라 인체 내부에서 피부미용에 도움이 되는 유효성분을 공급해야 함.
- (2) 일반적으로 피부 손상을 막기 위한 방법으로 UV 차단제나 주름개선에 효과가 있는 물질이 함유된 기능성 화장품을 사용하거나, 의약품을 피부에 직접 도포하는 것이 일반적이며, 이런 화장품 및 의약품은 국소부위에 적용하여 피부 건조를 예방하고나 보습 효과적이나 이러한 외용제들은 효과가 일시적이며 도포한 부위에만 국소적으로 효과를 나타낸다는 한계점을 가지고 있음
- (3) 피부는 바깥층인 각질층(Cornified layer)을 포함한 표피(Epidermis), 그 아래 진피(Dermis), 가장 아래 피하지방층(Hypodermis)으로 구성되어 있으며, 대부분의 피부 보습 화장품은 표피에 작용하지 못하고 각질층의 수분 및 유효성분 흡수에만 도움을 주지만 기능성 물질이 함유된 이너뷰티(Inner Beauty)소재는 피부에 직접 사용하지 않고 소화기를 통해 섭취함으로써 체내의 피부건강 환경을 조성함으로써 각질뿐만 아니라 표피층 전체와, 진피층의 피부 조직에 작용하여 보습, 주름개선 및 미백효과를 나타낼 수 있음.

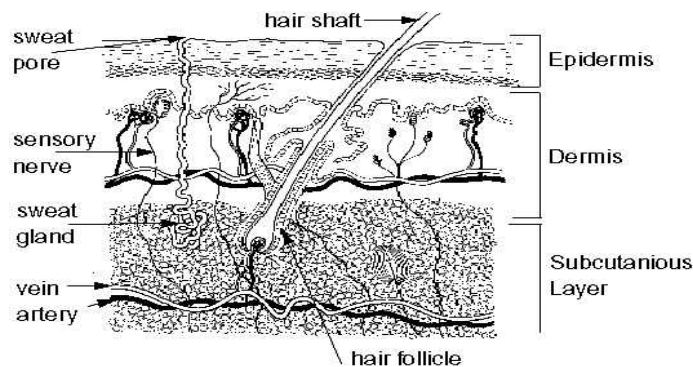


그림3. 인간의 피부 층 구조

- (4) 그러나 이너뷰티(Inner Beauty)식품 소재들은 거의 대부분 외국에서 연구된 결과 및 생산된 원료를 이용하여 제품을 개발, 생산하고 있는 실정으로, 앞으로 새로운 피부질환 이너뷰티(Inner Beauty)식품 소재 생산 기술을 개발하고, 국내의 피부약물 및 이너뷰티(Inner Beauty)식품 소재 시장을 지키기 위하여 피부 연구 분야에 적극적으로 기술개발이 필요함.

다. 백장미(*Rosa spp*)의 피부기능성 소재 개발 필요성

- (1) 백색의 백장미 (*Rosa spp*)는 넓은 지역의 동아시아에 분포하고 있는 장미종이이며, 차 및 장미오일 등의 원료와 잼 등을 만드는 데에 사용되어 왔음. 그의 뿌리는 한국의 전통요법으로 당뇨병, 통증 및 만성염증질환에 사용되어 왔을 뿐 아니라, 최근, 장미꽃이 응축된 가수분해성 탄닌이 항산화 활성을 갖는 것으로 보고되고 있어 강력한 항산화 및 항염증효과를 가질 것으로 보고되고 있음.
- (2) 백장미 추출물의 선행연구 결과 항균 효능에 있어서 백장미 꽃잎 추출물(white rose petal extract, WRPE) ethanol fraction (WRPE-EtOH)과 butanol fraction (WRPE-BuOH)은 헬리코박터균, 여드름균, 비듬균, 아토피 유발포도상구균은 물론, 각종 식중독균(*Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* 등)에도 항균효능을 나타냄. 또한 항염증 효능에 있어서도 백장미 꽃잎 추출물 hexane fraction 은 SNAP이나 대식세포로부터 분비되는 nitric oxide (NO)를 ascorbic acid(Asc)와 유사한 수준으로 억제함[Park, D., *et al.* (2009) *Biochem. Cell Biol.* 87: 943 - 952].
- (3) 주름개선 효능에 있어서 백장미 꽃잎 추출물 ethanol (EtOH)과 butanol (BtOH) fractions은 collagen 분해효소인 metalloproteinase-1 (MMP-1)을 농도의존적으로 억제함. 미백 효능에 있어서도 ethano alc butanol 분획 모두 melanin 생성효소인 tyrosinase를 농도의존적으로 억제함
- (4) 아토피 개선 효능에 있어서 백장미 꽃잎 추출물 water (W), butanol (B) 및 hexane (H) fractions은 DNP-Anti-DNP로 유발한 면역반응에 의한 혈관 누출반응을 효과적으로 억제함(Fig. 7)[Jeon, J.H., *et al.* (2009) *Arch. Pharm. Res.* 32: 823-830].
- (5) 선행연구 결과 백장미(*Rosa spp*)의 피부기능성에 대한 확인은 국제적으로 최초이며, 다양하고 높은 유효한 결과는 피부기능성 소재 후보 물질로 개발이 가능할 것으로 기대

라. 백장미로부터 피부미용 기능성 성분의 추출 기술개발 필요성

- (1) 백장미꽃에는 각종 영양성분 및 섬유질과 피부미용 생리활성물질들(Gallic acid, Rutin, Myricetin, Quercetin, Kaempferol)이 풍부하게 함유하고 있는데 목표 성분의 효율적인 추출을 위해서는 생물학적, 물리적, 화학적방법등의 다양한 적용이 필요.

표2. 장미 추출물의 Phenolic compounds 함량 (mg/g dw)

Gallic acid	Rutin	Quercitrin	Myricetin	Quercetin	Kaempferol
50	6.25	25	50	50	37.5

- (2) 추출기술로 열수추출법, 에탄올 추출법, 고온가압추출법, 초임계추출법, 초음파추출법, 마이크로웨이브추출법등이 있으며, 단독추출법과 다중추출법을 적용하여 최적의 추출법을 선택하고 기능성분의 HPLC, GCMS분석을 통하여 최적 수율확인파 경제성 평가 필요
- (3) 천연물로부터 기능성 성분의 추출법은 현재 활발히 연구 중에 있으며 앞으로 천연물

유래 기능성 성분의 수요가 늘어남에 따라 고 효율 고 수율의 추출법의 개발이 필요할 것으로 사료되는 가운데, 특히 장미 및 화훼의 추출법은 연구 논문 및 특허가 많이 부족한 실정이며, 장미로부터 고 효율의 기능성 성분을 추출할 수 있는 공정개발이 필요함.

마. 백장미로부터 피부미용 기능성 성분의 분석기술 개발 및 분리 동정 기술 필요성

- (1) 백장미 꽃잎 추출물의 피부미용 기능성 성분 확인과 백장미 유래 후보 소재 (지표물질)를 선정하기 위해 GCMS를 통한 분석기술개발 및 소재후보 물질을 동정하고 분리하는 연구를 통해 single active ingredient를 분리하고 구조 분석필요

바. 백장미 유래 피부미용 기능성분 강화 기술 필요성

- (1) 천연물 유래 기능성 소재는 화학적인 변형과 생물전환을 이용하여 분자구조에 구조적인 변화를 줄 수 있는데 이런 약간의 변형을 통하여 물리화학적 특성을 크게 변화시킴. 장미에 함유되어 있는 Quercetin은 항히스타민제 또는 항염증제로서 효과를 보이는데 methylation이 되면 소수성이 증가하여 세포막 투과가 쉬어지며 혈관내피세포손상 방지 효과를 보이는 isorhamnetin으로 전환되어 그 부가가치가 수백배 상승되었고, 담자균류에 속하는 균으로 발효시킨 장미 발효 추출물은 독성, 부작용이 없었으며, 피부에 자극을 주지 않고, 향의 강도와 향이 오래 지속되는 효과를 나타내었음.
- (2) 생물전환 기술은 화학합성법에 비해 안전하며 효율성이 큰 이점이 있어 고부가가치 기능성 소재(phytochemical)의 개발에 주로 사용되고 있음. 따라서 기능성 우수하고 강화된 소재(phytochemical)를 개발하기 위해서는 천연물 소재에 적합한 생물전환 기술이 필요함.

사. 백장미로부터 피부미용 기능성 성분 추출공정 최적화 및 대량생산 기술 필요성

- (1) 경제적 생산 공정 개발을 위해 추출방법에서 개선 가능한 공정을 설정하고 추출 조건 개선을 통하여 최적의 수율을 가지는 조건을 찾아 백장미로부터 기능성 물질 추출법 최적화 연구가 필요하며 반응표면 분석법(Response Surface Methodology)의 중심합성계획법(Central Composite Design)을 이용하여 최적 조건 설정.
- (2) Lab scale 추출공정을 경우 실제 대량생산 공정에 적용하기 위해서는 사전 장비검토가 필요하며 대량생산공정에 적용에 필요한 수율 및 scale up 단계의 연구가 필요. 생산량 상응하도록 용매 및 각 원료의 양을 늘리고 위 단계에서 설정한 것과 동일한 추출방법에 의해 추출을 진행하고 대량생산된 추출물의 유효성분 및 지표성분 확인필요. 필요시 상품성과 안정성을 위한 추가 공정 검토.

아. 피부미용 기능성분을 이용한 이너뷰티(Inner Beauty) 기능성 음료 개발 및 시제품 생산 기술

- (1) 기능성 음료로 개발되기 위해 제품기획 단계에서 외부 소비자 수용도 조사와 개발가능성 검토, 시장침투 전략 연구진행. 레시피 개발을 통해 물성과 관능에 대한 기준을 설정한 뒤, 원료수급계획을 작성하여 법규와 식품공전 등에 따라 각 원료의 적법성평

- 가. 제품의 안전과 기능성분의 안정성 위한 공정을 개발과 유통기한 설정 연구 필요
- (2) 또한 천연물 유래 기능성 물질은 식품제조 시 가공방법과 첨가되는 타 식품에 따라 그 기능성에 저하되거나 배가될 수 있는 물질임. 따라서 기능성 물질의 물리화학적 특성에 맞는 식품제조기술의 개발이 필요함.

자. 장건강 고부가가치 와인 생산 기술개발 필요

- (1) 연구에 따르면 서구인과 우리나라 사람과의 와인에 대한 향미의 선호도가 다르다고 보고하고 있음. 즉, 서구인은 와인이 어느 정도 짙은맛이 있어야 무게가 있다고 좋아하며 연한 향을 선호하는 반면 우리나라 사람은 뽕고 쓴맛을 싫어하고 달콤하며 과일 향이 높은 것을 좋아하는 성향이 포도주의 선호도를 결정하였다고 함.
- (2) 점차 가족 규모와 식생활 패턴이 변화함에 따라 와인 소비문화가 자리를 잡게 되고, 더불어 와인의 다양한 건강기능성이 알려지고 웰빙 (Well-being)에 대한 관심이 증가함에 따라 와인의 소비량 증가 이에 따라서, 국내 와인시장은 2001년 2310만 달러에서 2002년 2939만달러, 2004년에는 4578만 달러로 수입량이 크게 늘어났음.
- (3) 따라서 우리의 와인원료와 시장은 외국과 차이 있는 사실을 고려 할 때 수입와인에 의존하기 보다는, 국내 소비자들의 취향에 맞고 다양한 기능성 성분을 함유하고, 장내 유익균을 증식시켜 피부 에도 좋은 고품질의 와인의 개발 필요.

3절 연구개발 범위

1. 피부미용 기능성분을 이용한 이너뷰티(Inner Beauty) 기능성 음료 개발 및 시제품 생산 기술 개발
 - 가. 백장미로부터 피부미용 기능성 성분의 추출 기술개발
 - 나. 백장미로부터 피부 미용 기능성 성분 추출공정 최적화 및 대량 생산 기술 개발
 - 다. 백장미의 기능성분 강화를 위한 대량 생산 기술 개발
 - 라. 피부미용 기능성분을 이용한 이너뷰티(Inner Beauty) 기능성 음료 개발 및 시제품 생산 기술개발
2. 백장미 추출물의 성분 동정 및 지표 물질 선정
 - 가. 기능성분 분석법 개발 및 확인
 - 나. 백장미 꽃잎 성분 분리 및 동정
 - 다. 지표물질 선정 및 표준화
3. 백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발 과 장내 미생물의 미치는 영향 및 이를 이용한 고부가가치 와인 개발
 - 가. 미생물을 이용한 기능성 성분 강화 기술 개발 및 생산
 - 나. 기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가
 - 다. 기능성 성분을 이용한 고부가가치 와인개발

4. 백장미 추출물을 이용한 피부 미용 기능성 확인

가. 주름개선 효과

나. 미백효과

다. 보습 효과

라. 아토피개선 효과

제2장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

1절 피부기능성 식품/음료/추출물 관련 특허 동향

1. 특허분석 범위

표1. 특허분석의 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽, 국제)
특허 DB	한국과학기술정보연구원 DB(ndsl.kr)
검색기간	2001년~2016년
검색범위	피부보습, 주름개선, 미백, 아토피(국문/ 영문검색) / IPCA23(식품 또는 식료품)

2. 국가별 특허 수

가. 한국과학기술정보연구원의 특허정보 검색을 통하여 한국, 미국, 유럽, 일본, 국제 특허 중 피부 건강(미백, 보습, 주름개선, 아토피 피부염 등)과 관련된 식품 등의 조성물에 대한 특허를 수집한 결과 2001년부터 2016년까지 총 4,160건의 특허가 확인되었음.

나. 수집된 특허를 특허청의 특허정보시스템으로 분석하여 국가별 특허 출원 건수 및 점유율, 연도별 출원인 및 출원건수 변화를 분석하였음.

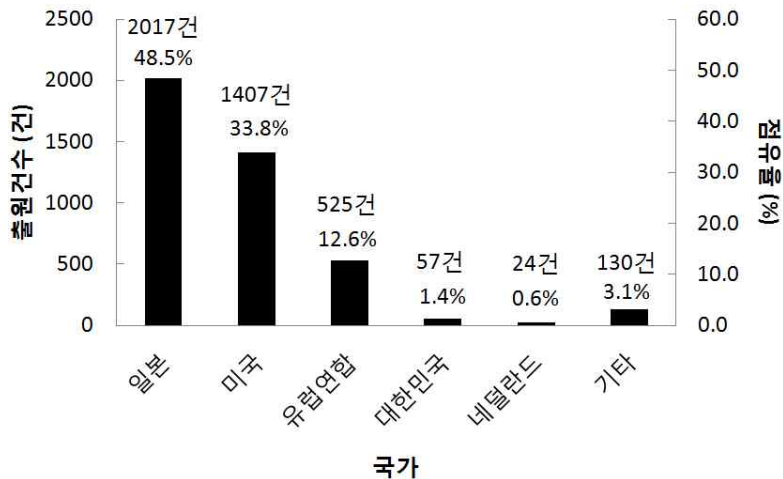


그림1. 국가별 특허 출원 건수

다. 특허 출원 국가를 분석한 결과 일본이 2017건으로 전체 특허 중 48.5%를 점유하여 가장 많은 특허를 발표 한 것으로 나타남.

라. 미국은 33.8 %(1407건), 유럽연합은 12.6 %(525건)을 점유하여 각각 2, 3위를 차지함.

마. 대한민국의 특허는 총 57건으로 전체 특허 중 1.4 %를 점유함.

2. 기술발전도 분석

가. 2001년 256건의 특허가 출원되었고, 2010년 319건 출원으로 10년간 증가와 감소를 반복하는 추세를 보였고, 2011년부터 다시 증가하기 시작하여 2014년 약 280여건의 특허 출원 건수를 보임

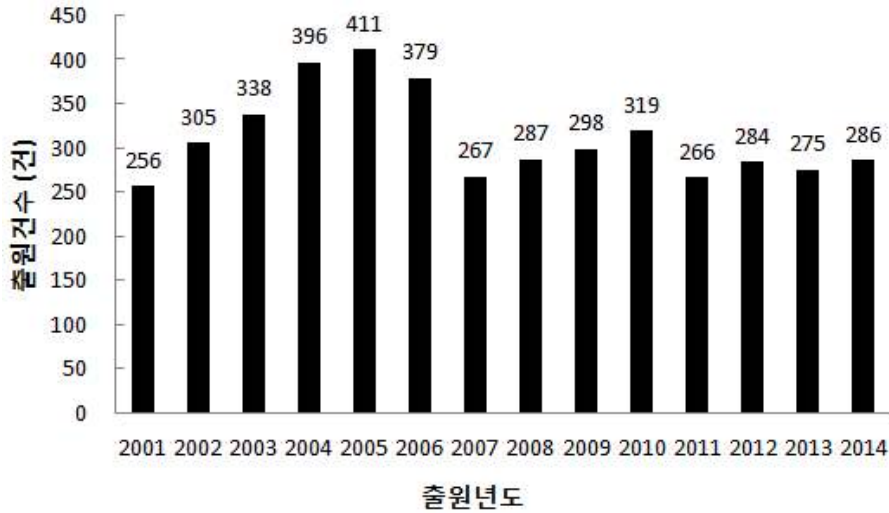


그림2. 년도별 특허출원건수 변화

나. 출원인의 변화 양상 또한 출원 건수의 변화와 거의 동일한 트렌드를 보이고 있음.

다. 전체적인 출원건수 변화를 보아 피부기능성 식품에 대한 연구는 신기술에 대한 개발은 2000년대 초반부터 2014년까지 활발.

라. 현재 국내 특허 출원 수에서는 유럽연합, 일본, 미국의 수준에 못 미치고 있으나 최근 5년간 신기술에 대한 특허 출원이 활발히 이루어지고 있어 추후 발전가능성이 더욱 큰 것으로 분석됨.

3. 핵심특허 비교

가. 유사 특허 중 피부건강 개선과 관련된 특허들과 비교 했을 때 본 과제를 통하여 개발하고자 하는 기술과의 유사성은 60 % 수준으로 분석됨.

나. 기타 특허들과 유사성에 있어서 피부주름개선, 보습효능, 미백효과, 아토피 피부염 증상 개선과 같은 효능들에 있어 대부분 1 ~ 2가지 증상만을 개선하는 조성물에 대한 연구를 진행하였음.

다. 특허, 기능성분의 원료에 있어 백장미 꽃잎이라는 피부 미용 기능성에 대한 이미지와 부합하는 천연원료를 사용한 특허가 거의 없다는 점에서 본 과제의 신규성에 대해서 인정받을 수 있을 것으로 판단됨.

라. 또한, 보습, 주름개선, 미백, 아토피 피부염 개선 등 다양한 목적으로 사용할 수 있다는 점에서도 본 연구과제 결과의 우수성을 입증할 수 있을 것으로 보임.

표2. 핵심특허 비교

핵심특허						
구분	특허명	보유국	등록년도	관련성(%)	유사점	차이점
국내	피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸 HY7714 및 이를 유효성분으로 함유하는 제형	한국	2015	60	피부주름 개선 및 보습 효능을 가지는 조성물 식품에 사용 가능	본 과제는 백장미꽃잎에서 기능성 성분 추출하였으며, 주름, 보습, 미백 및 아토피 피부염 증상 개선에 효능이 있음을 확인
국내	유효성분이 보존된 초저온 액체질소로 추출된 동백꽃잎수	한국	2010	60	원료에서 유효성분을 추출하여 활성 측정	본 과제는 백장미꽃잎에서 기능성 성분 추출
국내	담자균류로 발효시킨 장미 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 향료 조성물 및 이의 제조방법	한국	2010	60	장미에서 유효성분을 추출하여 안정성 측정	본 과제는 백장미꽃잎에서 기능성 성분 추출
국내	아토피 피부염 예방 및 치료용 조성물	한국	2011	70	장미추출물을 이용하여 아토피 예방 및 치료용 조성물로의 효과 확인	본 과제는 백장미추출물의 복합적인 기능성 확인
국내	장미 추출물 함유 조성물	한국	2009	70	장미추출물을 이용한 조성물의 여드름성 색소침착 억제 효과 확인	본 과제는 백장미추출물의 복합적인 기능성 확인
국외	COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ATOPIC DERMATITIS INCLUDING GALENICAL EXTRACT OR LACTOBACILLUS FERMENTATION THEREOF	미국	2013	60	아토피 피부염 치료 및 보존용 조성물	본 과제는 백장미추출물의 복합적인 기능성 성분을 추출하였으며, 주름개선, 보습, 미백에도 효능이 있음을 확인
국외	COSMETIC COMPOSITION, FOOD/DRINK COMPOSITION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION EACH CONTAINING HYBRID TEA ROSE OR EXTRACT THEREOF	일본	2011	80	장미추출물을 함유하는 화장품, 음식, 의약품 조성물로의 효과 확인 (항노화작용-콜라게나제, 엘라스타아제 저해작용 및 항산화 작용)	본 과제는 백장미추출물의 복합적인 기능성 확인
국외	ORAL MELANOGENESIS INHIBITORY COMPOSITION AND FOOD CONTAINING THE SAME	일본	2010	70	장미추출물을 함유하는 경구용 멜라닌생성억제 조성물로의 효과 확인	본 과제는 백장미추출물의 복합적인 기능성 확인

2절 이너뷰티 식품 시장 현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

가. 건강기능식품

- (1) 노화방지를 위한 해결책으로 기능성 화장품에만 의존하는 경향이 지배적이었으나 몇 년 전부터 식품성분의 경구 섭취를 통해서도 피부의 건강, 노화 상태가 개선될 수 있다는 연구 결과들이 꾸준히 도출되면서 건강기능식품 시장이 주목받고 있음.
- (2) 피부건강 기능성 관련 건강기능식품 원료는 고시형 원료로 4종류, 개별인정형 15종류가 인정되어 있음. 고시형 원료로 엽록소 함유식물, 스피루리나, 클로렐라, 알로에 겔이 있으며, 개별인정형 원료로는 곤약감자추출물, 쌀겨추출물, 히알루론산나트륨 등이 있음.
- (3) 피부건강 기능성 관련 건강기능식품 원료 인정 건수는 '체지방감소', '혈당조절', '장 건강', '면역기능'에 이어 전체 5번째 순위에 해당함.(2015.04. 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황, 식품의약품안전처)
- (4) 건강기능식품 중 피부건강관련 기능성 내용
 - (가) 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강을 유지하는데 도움.
 - (나) 피부보습에 도움.

나. 국내 이너뷰티 시장

- (1) 국내 이너뷰티 시장은 2012년부터 2015년까지 연평균 37 % 성장을 보이고 있으며, 그 규모는 현재 약 4000 억 원대로 추정됨. 식품 대기업들이 지속적으로 새로운 상품을 출시하면서 시장이 점차 성장추세. 일부 제품은 건강기능식품으로 인정을 받기도 하였으며, 중국 전자상거래 사이트인 '텐마오'등을 통하여 인터넷 판매가 증가하는 등, 판매경로의 다양화를 보여주고 있음.
- (2) 현재까지 우리나라에서 자체 개발을 통해 생산되고 있는 미용·노화방지식품 원료는 세계적인 수준과 비교해 볼 때 미미한 수준이나, 일부 기업을 중심으로 경쟁력 있는 원료를 자체 생산하고 있으며, 각 지역의 특산물과 지원을 활용해 부가가치가 높은 미용·노화방지식품을 생산하기 위한 경쟁이 치열하게 진행되고 있음.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

가. 일본 이너뷰티 시장

- (1) 일본의 이너뷰티 산업은 2013년 2조3천억원을 넘어서 안정적인 시장을 형성한 것으로 평가됨. 시장 성장 요인으로는 스틱 젤리 등 새로운 제형의 개발과 플라센타 등의 신성분의 발견에 의한 것으로 분석됨. 또한, 피부미용, 노화방지, 미백, 체질 개선 등 4 가지 분야로 나뉘어 고른 성장을 보이고 있는 것 또한 특징으로 평가됨.
- (2) 이너뷰티 제품 분야별로는 서플리먼트 시장이 1929억엔으로 대부분을 차지. 스틱 젤리가 88.5억엔, 간식류의 가공식품이 25억엔 시장을 형성하고 있음.(뷰티경제, 2013)

나. 중국 이너뷰티 시장

- (1) 최근 중국에서 황사, 배기가스 다량 배출 등 대기오염의 심각성이 집중 조명되자 피부 건강에 대한 사회의 관심이 높아짐. 이에 따라 피부 건강에 민감한 젊은 여성층을 시작으로 이너뷰티(inner beauty) 트렌드가 확산됨.
- (2) 중국인들의 피부 관리에 대한 관심이 높아지면서 국내기업들이 중국 시장 공략을 위한 카드로 이너뷰티 제품을 내세우고 있음.
- (3) 중국 건강기능식품 시장 규모는 약 35조원대로 이 중 이너뷰티 시장은 3조2800억원에 달하는 것으로 평가됨. 향후 이 시장은 5년간 35 %이상 성장할 것으로 예측.(브리짓 경제, 2016)

표 3. 국내외 이너뷰티 제품

제품명	하나마이 100 % 콜라겐	collagen beauty drink	이너비 아쿠아리치	VB 프로그램
판매사	하나마이	Shiseido	CJ 제일제당	아모레퍼시픽
사진				
제품 기능	피부탄력, 피부보습	피부탄력, 피부보습	피부탄력, 피부보습	피부탄력, 피부보습
용량	45 g(1.5 g x 30스틱)	50 mL	28 g(500 mg x 56정)	600 mL (20mL x 30앰플)
주요 원재료	돈피콜라겐	피쉬콜라겐, 히알론산, 세라미드, GABA, 오르니틴, 로얄젤리	히알루론산, 쌀겨추출물, 포도씨유, 피쉬콜라겐, 글리세틴, D-소르비톨액	정제수, 피쉬콜라겐펩타이드, 자일리톨, 베리혼합농축액, 비타민, 히알루론산, 펩타이드
주요 특징	100% 콜라겐만을 정제, 추출하여 저분자화 된 콜라겐으로 체내 흡수 및 소화가 빠름	독자적 미용 특허 성분인 이끼모모 및 아 무라과실을 첨가하였으며, 저분자 피쉬콜라겐, 히알론산, 세라미드, GABA, 비타민 등을 배합하여 만든 피부 미용 드링크	생리활성기능 2등급 기능성 물질인 히알우론산나트륨 및 쌀겨추출물과 콜라겐을 배합하여 피부 탄력과 보습에 도움을 주는 보충제	흡수가 빠른 저분자 콜라겐으로 콜라겐을 보충시켜 피부보습력을 증진시키고 콜라겐 감소를 완화시켜줌

3절 연구과제 기술개발의 성과 및 의의

1. 연구과제 기술개발 성과

가. 기술개발 성과 요약

- (1) 백장미에서 피부건강 기능성분 추출 수율 향상(15 % -> 40 %) 및 추출방법 최적화

- (2) 백장미 추출물의 주요 폴리페놀 성분 4종 확인 및 gallic acid를 지표성분으로 선정
- (3) 백장미 추출물의 gallic acid를 pyrogallol로 전환하는 유산균의 동정 및 bioconversion을 이용한 pyrogallol 전환기술 확보(pilot scale 기준 전환율 70 % 이상)
- (4) 백장미 추출물의 피부미백, 보습, 주름, 아토피 피부염 개선에 대한 경구투여 효능 확인
- (5) 백장미 추출물이 장내균총에 미치는 영향 및 장건강 기능성 효능 확인
- (6) 백장미 추출물을 활용한 제품 5종 개발 및 2종 시생산 완료

2. 연구과제 기술개발의 의의

- (1) 백장미 추출물은 기존에 피부기능성 식품 원료로 이용되지 않았던 소재로서 본 연구과제를 통해 기능성 식품소재로서 백장미 추출물의 활용 증가 및 백장미 재배 농가의 수익 증대가 기대됨.
- (2) 국내외 주요 저널에 11편의 논문을 게재함으로써 백장미 추출물 활용 연구 및 피부미용 기능성 식품, 백장미와 유사한 식물 추출물의 기능성 연구 등 추후 타 연구의 선행 연구 자료로서 활용이 가능할 것으로 판단됨.
- (3) 국내 2건의 특허 출원을 통하여 추후 기술이전 및 해당 특허를 활용한 사업화를 통하여 경제적 성과를 기대할 수 있음.
- (4) 본 연구과제의 성과는 국내외 기술 수준에 비추어 볼 때, 최고 수준의 기술 수준을 100으로 하여 비교한 결과 90정도의 우수한 수준으로 평가됨.
- (5) 본 연구과제를 통해 확인한 백장미 꽃잎 추출물의 기능성을 바탕으로 추후 건강기능식품 시장 및 이너뷰티 시장 확장에 기여를 할 수 있을 것으로 사료됨.

제3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

1절 백장미로부터 피부미용 기능성 성분의 추출 기술 개발

1. 추출조건 및 추출 효율 비교

가. 실험재료

- (1) 본 연구에 사용한 식용백장미(*Rosa spp.*) 꽃잎은 충청북도 진천의 '로즈랑스'로부터 구입한 것을 사용.

나. 추출물의 제조

- (1) 추출조건설정 및 추출효율 비교를 위해 식용백장미추출물(edible white rose extract)은 총 다섯 가지 방법을 이용하여 제조하였으며, 열수 추출, 에탄올 추출, 고온가압 추출, 효소처리 추출, 초임계 유체 추출 방법을 이용. 각각 다른 방법에 따라 추출된 추출물은 감압증발기(evaporator)를 이용하여 용매를 증발시킨 후 동결건조 시료를 실험에 사용(Fig. 1.). 추출효율은 식물 유래의 생리활성물질로 알려진 총 폴리페놀 함량으로 평가.

(가) 에탄올 추출은 건조 백장미를 10 ~ 80 % 에탄올과 1:15 ~ 1:45 비율로 섞어 항온수조(30 °C ~ 50 °C)에서 3시간 동안 가열하여 추출을 하였고, Whatman paper filter No.4를 이용하여 감압필터를 통해 여과하여 추출물을 제조.

(나) 고온가압 추출은 건조 백장미를 물과 1:25 비율로 섞어 autoclave를 이용하여 105 °C, 110 °C, 121 °C에서 1~3시간동안 가압 가열하여 추출하였고, Whatman paper filter No.4를 이용하여 감압필터를 통해 여과하여 추출물을 제조.

(다) 효소 처리 추출은 건조 백장미를 pH 4.5의 물과 1:25 비율로 섞어 Novozyme에서 제공 받은 Pectinex® Ultra AFP, Pectinex® SMASH XXL, Viscozyme®, Celluclast® 는 건조 장미 대비 5 % 비율로 사용하여 40 °C에서 25 시간동안 가열 추출하였고, Whatman paper filter No.4를 이용하여 감압필터를 통해 여과하여 추출물을 제조.

(라) 열수 추출은 건조 백장미를 pH 3~9의 물과 1:25 비율로 섞어 항온수조(90 °C)에서 1~3시간동안 가열하여 추출을 하였고, Whatman paper filter No.4를 이용하여 감압필터를 통해 여과하여 추출물을 제조.

(마) 초임계 유체 추출은 이산화탄소를 사용하였으며, modifier로 80~100 % ethanol을 사용. 압력은 300~400 bar에서 추출을 진행하였으며, 추출온도는 40~60 °C로 하여 추출물을 제조.

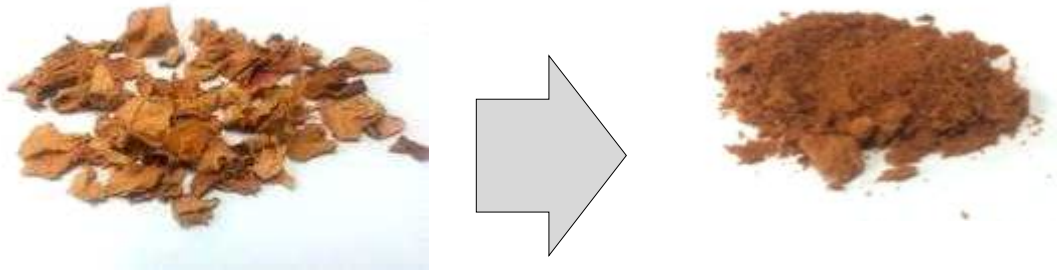


Fig. 1. White rose petal raw sample(left) and freeze dried white rose petal extract(right).

다. 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 총 폴리페놀 함량 분석의 Standard solution은 gallic acid를 사용하며 농도는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 mg/L로 조제. 샘플 또는 blank(물) 100 μ l에 2N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μ l를 넣어 발색시킨 뒤, 300 μ l의 20 % Na_2CO_3 를 넣어 15분간 실온에서 방치 한 후 1 ml의 증류수를 넣은 다음 1250 rpm에서 5분간 원심분리. 상등액을 UV spectrophotometer 로 725nm에서 흡광도 측정하여 시료의 총 폴리페놀 함량을 계산.

2. 추출 방법별 효율 비교

가. 에탄올 추출법 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 최적의 가수비를 찾기 위하여 15:1, 25:1, 35:1, 45:1 4가지 가수비 조건에 대하여 실험 진행. 추출온도 50 $^{\circ}\text{C}$, 추출시간 3 hr, 에탄올 농도 50 %의 조건에서 실험한 결과, 가수비 25:1의 조건에서 가장 추출효율이 좋았으며, 추출된 폴리페놀의 함량은 추출물 1 g당 237.9 mg 이었음.

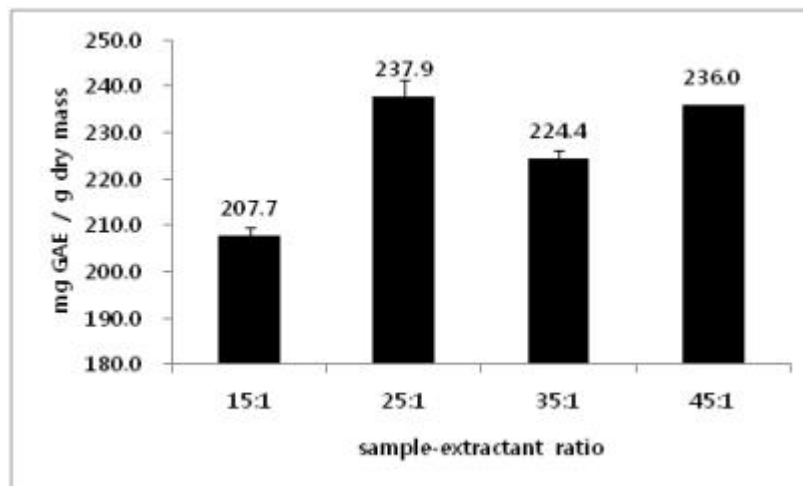


Fig. 2. Effect of sample to extractant ratio on total polyphenol contents of white rose extract.

(2) 가수비 1:25, 추출온도 30, 50 $^{\circ}\text{C}$, 추출시간 3 hr으로 고정하고 에탄올 농도별(10~80 %) 총 폴리페놀 추출 결과, 추출온도 50 $^{\circ}\text{C}$, 에탄올 농도 50 %에서 가장 추출효율이 높았으며, 이 때, 추출된 폴리페놀의 함량은 추출물 1 g당 237 mg의 폴리페놀이 추출

됨.

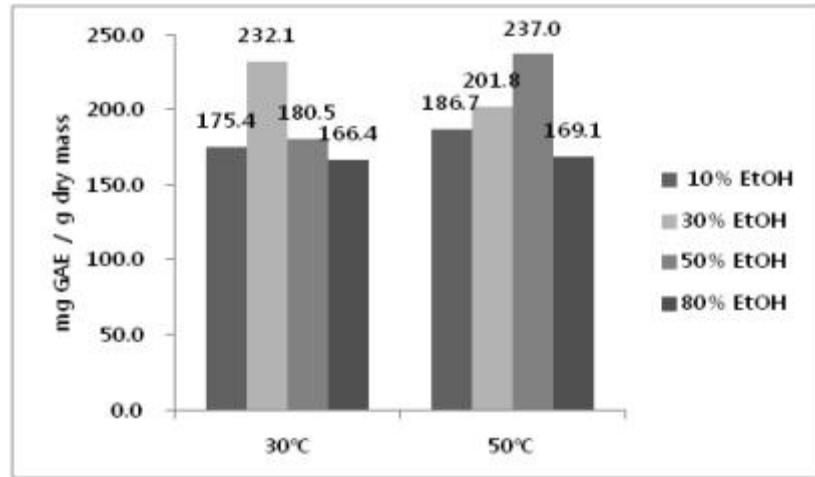


Fig. 3. Effect of ethanol concentrations and extracting temperature on total polyphenol contents of white rose extract.

나. 고온가압 추출법 총 폴리페놀 함량 측정

(1) Autoclave를 이용하여 105, 110, 121 °C 조건에서 1~3시간동안 추출한 결과, 105 °C, 1시간에서 가장 높은 추출물 1 g당 236.7 mg의 폴리페놀 추출이 이루어진 것을 확인함.

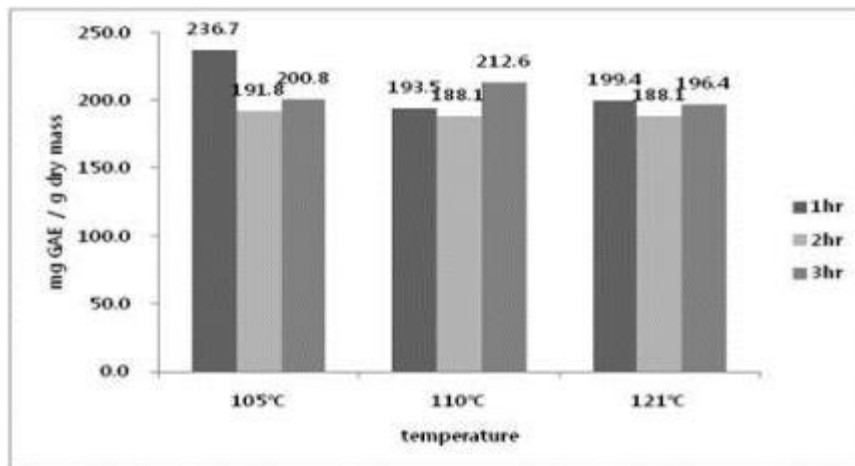


Fig. 4. Effect of heating time and extracting temperature at high pressure on total polyphenol contents of white rose extract.

다. 효소 처리 추출법 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 효소처리는 총 4가지 상업적 enzyme를 사용하였으며, 추출결과 Pectinex® SMASH XXL를 사용한 실험에서 가장 많은 1 g당 168.6 mg의 총 폴리페놀이 추출됨.

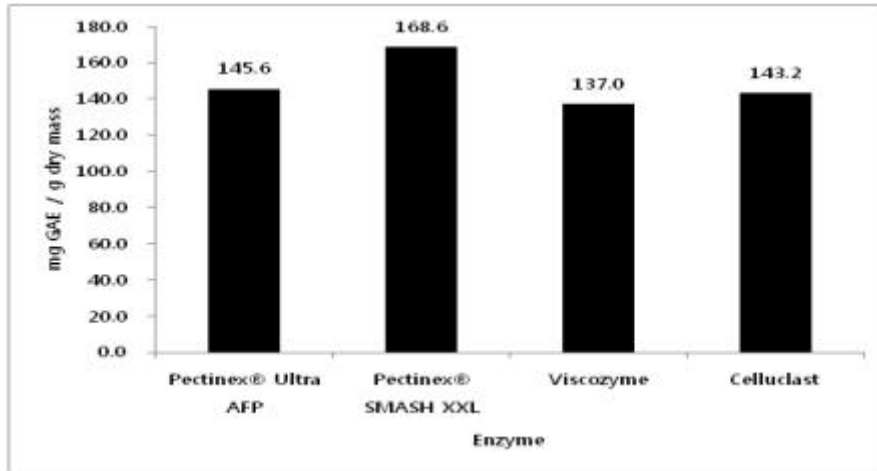


Fig. 5. Effect of four types of cellulolytic enzymes on total polyphenol contents of white rose extract.

라. 열수 추출법 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 가수비 1:25, 추출온도 90 °C으로 고정하였을 때, 추출 시간에 따라 총 폴리페놀 함량이 점차 증가하는 양상을 보였음. 120 min에서 가장 높은 192.2 mg GAE / g dry mass의 총 폴리페놀이 추출되었으며 180 min에서는 오히려 감소하는 결과가 나타났음. 고온에서 장시간 추출을 함에 따라 프로안토시아니딘 같은 일부 폴리페놀이 분해되어 감소한 것으로 추정됨.

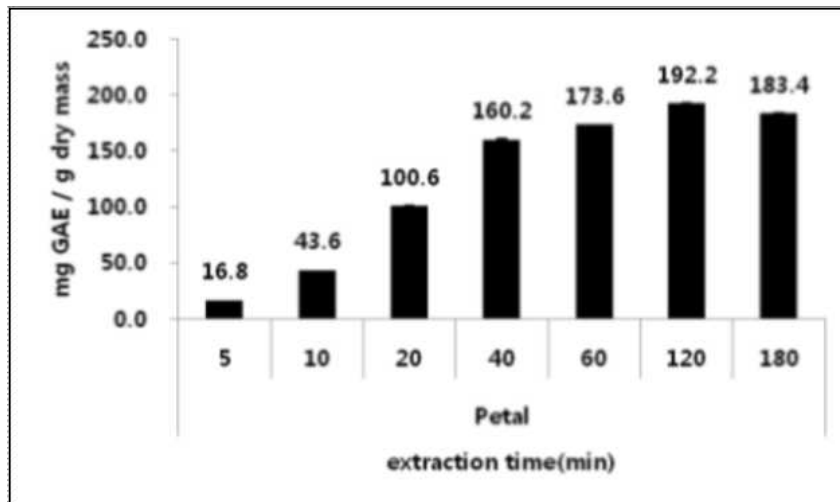


Fig. 6. Effect of extraction time at hot water extract on total polyphenol contents of white rose extract.

마. 초임계 유체법 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 초임계 유체 추출의 경우 추출물의 형태가 gel혹은 sol형태에 가까운 추출물이며, 유지 성분이 많이 함유된 형태로 그 추출효율이 고형분 기준 1.5 %수준으로 낮았으며 순수한 물에 불용성 성분이 대부분 차지.

바. 추출방법 별 총 폴리페놀 추출 효율 비교

(1) 에탄올 추출, 열수 추출, 고온가압 추출, 효소처리 추출 실험결과 각각 최고 효율을 나타낸 조건의 결과를 비교해 봤을 때, 에탄올 추출법(50 °C, 50 % 에탄올, 3 hr 추출 시)에서 237.0 mg GAE / g dry mass, 열수 추출(90 °C, 2 hr 추출 시)에서 192.2 mg GAE / g dry mass, HTHP(고온고압) 추출(105 °C, 1 hr 추출 시)에서는 236.7 mg GAE / g dry mass, Enzyme 추출(Pectinex® SMASH XXL)에서는 168.6 mg GAE / g dry mass의 폴리페놀이 추출되어 에탄올 추출법이 가장 높은 추출효율을 보였음.

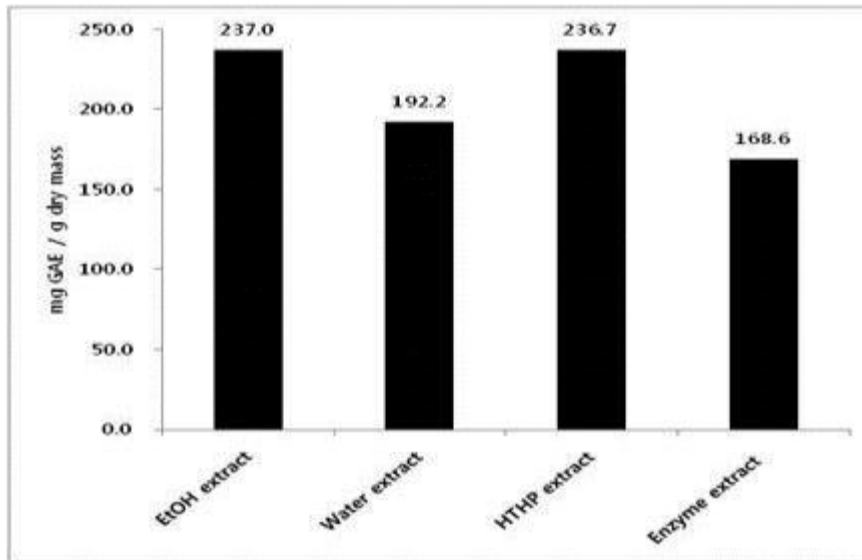


Fig. 7. Comparison of extract efficiency of total polyphenol by various extraction method.

2절 추출방법 선정/추출조건 확립 및 최적화

1. 추출방법 선정

가. 추출효율 비교를 통하여 최종적으로 대량생산에 적용할 추출법으로 에탄올 추출법과 열수 추출법을 선정하였음. 에탄올 추출법은 폴리페놀 추출 효율이 가장 높았기 때문에 선정되었고, 고온가압 추출법의 효율이 두 번째로 좋았으나, 본 연구과제의 목적인 기술 실용화에 있어서 대량생산 적용 및 생산 경제성 평가가 열수 추출법이 더욱 우수하므로 두 번째 추출방법으로 열수 추출법을 선정하였음.

2. 에탄올 추출법 최적화

가. 반응표면분석법

(1) 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)은 여러 독립변수들이 복합적인 작용을 하여 한 개나 여러 개의 종속변수들에 영향을 줄 때, 그 작용의 관계를 통계적으로 분석하는 방법으로 추출조건에 따른 추출특성을 연구하고 수율 최적화에 사용함.

나. 중심합성 계획법

(1) 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획 (central composite design, CCD)법으로 실험설계에 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 MINITAB (Release 14, Minitab Inc., State College, PA, USA)을 이용함. 디자인에 따라 추출된 추출물의 고형분 함량 및 폴리페놀, 플라보노이드 함량, DPPH 소거능을 각각 이차반응 모형식에 적용, 다중회귀분석에 의하여 분석하여, 최적의 추출 조건을 결정함. 2차 회귀식에서 β_0 는 상수이고, β_i , β_{ii} , β_{ij} 는 회귀계수로 추출 최적화에 사용된 이차반응식은 아래와 같음.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j$$

다. 변수의 설정

(1) 추출조건의 최적점을 찾기 위해 반응표면분석법을 이용하였으며, 변수로는 X_1 = 에탄올 농도, X_2 = 추출온도, X_3 = 가열시간(Table 1.), Y_1 = 고형분 함량, Y_2 = 폴리페놀 함량, Y_3 = 플라보노이드 함량, Y_4 = DPPH Scavenging activities를 설정. 중심점은 에탄올 농도 50%, 추출온도 50°C, 가열시간 60분을 기준으로 하고 -1.68, -1, 0, 1, 1.68의 5 level로 반응표면 분석을 설계함. 추출조건은 시료와 용매의 가수비는 1:25로 고정하여 진행.

Table 1. The coded levels of 3 independent variables in the central composite design for optimization of extraction conditions

Factor	Independent variables	Coded levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
X_1	Ethanol Concentration(%)	1	21	50	79	99
X_2	Extraction temperature(°C)	25	35	50	65	75
X_3	Extraction time(min)	1	25	60	95	119

라. 최적조건의 설정 항목

(1) 반응표면분석을 통하여 설계된 추출조건을 통하여 추출한 다음 최적조건의 설정을 위하여 아래 방법들을 통하여 폴리페놀 및 플라보노이드, 항산화능과 고형분 함량에 대한 추출 효율을 측정함.

(2) Total polyphenol 측정

(가) 시험에 사용되는 추출물은 동결 건조하여 이용하며, Standard solution은 gallic acid를 사용하며 농도는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 mg/1로 조제. 샘플 또는 blank(물) 100 μ l에 2N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μ l를 넣어 발색시킨 뒤, 300 μ l의 20 % Na_2CO_3 를 넣어 15분간 실온에서 방치한 후 1ml의 증류수를 넣은 다음 1250 rpm에서 5분간 원심분리. 상등액을 UV spectrophotometer로 725 nm에서 흡광도 측정하여, 총 폴리페놀 함량은 표준물질로서 gallic acid를 이용하여 얻은 회귀곡선으로부터 시료의 총 폴리페놀 함량을 계산하였음.

(3) Total Flavonoid 측정

(가) 시험에 사용되는 추출물은 동결 건조하여 이용하며, Standard solution은 catechin hydrate를 사용하며 농도는 20, 40, 60, 80, 100, 1000 mg/1로 조제. 샘플 또는 blank(물) 1 ml에 증류수 4ml을 섞은 뒤, 5 % NaNO_2 0.3ml로 조제. 5분 뒤, 10 % AlCl_3 0.3 ml을 넣고 6분 뒤, 1M NaOH 2 ml을 넣은 뒤, 증류수를 넣어 총 10 ml이 되도록 조정. 잘 섞어준 뒤, UV spectrophotometer 로 510 nm에서 흡광도 측정하여, 총 플라보노이드 함량은 표준물질로서 catechin을 이용하여 얻은 회귀곡선으로부터 시료의 총 플라보노이드 함량을 계산하였음..

(4) 항산화능 측정((1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging)

(가) 항산화 시험법은 DPPH assay를 이용하였으며, 32 mg의 DPPH를 1 L의 80 % methanol에 녹여 준비 한 뒤, 3 ml의 DPPH 용액을 큐벳에 넣고 200ul의 샘플을 넣어 혼합. 암실에서 1시간동안 반응시킨 뒤, UV spectrophotometer 로 517 nm에서 측정. blank는 80 % methanol을 사용하였으며, Negative control은 DPPH용액을 사용. Positive control로 L-ascorbic acid와 gallic acid를 사용하였음. 라디칼 소거능의 계산은 $(Ac-As)/Ac \times 100$ 으로 계산하였음. (Ac:Control흡광도, As:Sample흡광도)

마. 측정 결과

(1) 고형분 함량 및 수율 측정

(가) 고형분 함량은 추출 수율을 결정하는 중요한 결과로, 모든 실험에서 동일한 장미꽃 (raw) 10 g을 이용하여 실험을 진행하였고, 추출물의 건조를 통하여 고형분 함량을 측정하였음.

(나) 추출물의 고형분 함량을 측정한 결과 run order 1번에서 가장 적은 함량을 확인할 수 있었으며, run order 2번에서 가장 높은 고형분 함량 4.096 g 을 얻을 수 있었음.

(다) 반응표면 분석은 위 실험결과를 이용하여 minitab14 software로 분석한 결과로 각 종속변수에 따른 독립변수의 변화정도를 아래와 같이 표면형의 그래프로 표시하여 최적의 실험조건을 찾을 수 있는 방법으로, Ethanol conc vs temp(A)에서 에탄올 농도, temp vs time(C)에서 시간에 대하여 최적점을 찾을 수 있으며, ethanol conc vs time(B)에서는 그래프의 안부점이 보이므로 최적화를 나타낸다고 할 수 있음.

(2) Total polyphenol 함량 측정

(가) 식물체에 존재하는 많은 생리활성 물질들이 폴리페놀류에 해당하므로 폴리페놀 분석

은 기능성분 분석에서 아주 중요한 분석 항목이라 할 수 있음.

(나) 추출물의 폴리페놀 함량을 측정한 결과 run order 17번에서 가장 적은 함량을 확인 할 수 있었으며, 폴리페놀의 농도는 run order 2(240.12 mg GAE / g dry mass) > 12 > 10 순으로 높았음.

(다) Ethanol conc vs temp(A)에서 에탄올 농도, temp vs time(C)에서 시간에 대하여 최적점을 찾을 수 있으며, ethanol conc vs time(B)에서는 그래프의 안부점이 보이므로 최적화를 나타낸다고 할 수 있음.

(3) Total flavonoid 함량 측정

(가) 플라보노이드는 폴리페놀 중에서도 강력한 항산화 기능과 여러 가지 생리활성 물질이 많은 화합물로 폴리페놀 분석과 함께 기능성분 분석에서 중요한 분석 항목이라 할 수 있음.

(나) 추출물의 플라보노이드 함량을 측정한 결과 run order 1번에서 가장 적은 함량을 확인할 수 있었으며, 플라보노이드의 농도는 run order 11(18.086 mg CE / g dry mass) > 5 > 12 순으로 높았음.

(다) Ethanol conc vs temp(A), Ethanol conc vs time(B)에서 에탄올농도에 대하여 최적점을 찾을 수 있으며, 플라보노이드 추출 시 폴리페놀보다 많은 시간 소요.

(4) 항산화능(DPPH 소거능) 측정 결과

(가) 항산화능의 비교는 모든 실험군에서 동일한 농도로 측정하여 DPPH scavenging activity로 비교분석. run order 1번에서 Control 대비(100 %) 가장 적은 scavenging activity(40 %)를 나타냈으며, 가장 강력한 항산화능은 2번(83.78 %)에서 나타남.

(나) Ethanol conc vs temp(A)에서 에탄올 농도, temp vs time(C)에서 시간에 대하여 최적점을 찾을 수 있으며, ethanol conc vs time(B)에서는 그래프의 안부점이 보이므로 최적화를 나타낸다고 할 수 있음.

Table 2. Central composite design of the independent variables(X_1 , X_2 and X_3) and experimental results for the response variables, extraction yield(Y_1), total phenolic contents(Y_2), total flavonoid contents(Y_3) and total antioxidant activities(Y_4)

Run Order	X_1 EtOH (%)	X_2 temp (°C)	X_3 time (min)	Y_1 (%)	Y_2 (mg GAE /g dry mass)	Y_3 (mg CE /g dry mass)	Y_4 (%)
1	99	50	60	18.64	120.68±5.54	11.315±0.14	40.00±5.41
2	50	75	60	40.96	240.12±1.80	16.872±0.55	83.78±4.08
3	79	65	95	34.83	207.53±3.84	16.600±0.23	66.49±5.32
4	50	50	60	36.29	210.54±4.95	16.142±0.41	75.14±0.00
5	50	50	119	39.00	194.62±2.01	17.342±0.15	74.59±4.22
6	79	35	25	20.74	179.70±4.93	14.415±0.29	51.35±2.48
7	50	50	60	36.03	210.00±2.61	15.913±0.14	74.59±1.43
8	50	25	60	31.53	191.25±18.38	13.912±0.41	65.95±3.29

9	21	35	95	33.96	201.28±13.52	15.486±0.03	68.65±1.43
10	50	50	60	36.63	215.12±9.28	16.354±0.32	78.92±0.54
11	21	65	95	33.86	213.71±4.95	18.086±0.16	71.89±4.42
12	50	50	60	33.23	224.93±1.49	16.935±0.23	67.57±3.90
13	50	50	1	15.21	183.96±6.51	12.879±0.12	50.81±1.62
14	79	35	95	28.26	197.31±4.19	13.941±0.11	48.65±0.54
15	50	50	60	34.76	212.52±1.11	16.521±0.09	70.27±0.00
16	21	35	25	29.05	191.26±2.76	15.830±0.37	50.27±1.43
17	1	50	60	35.64	169.40±7.21	13.420±0.39	54.05±2.16
18	50	50	60	37.98	214.52±1.22	16.072±0.15	74.89±2.81
19	21	65	25	38.68	206.99±0.88	16.848±0.15	65.41±2.16
20	79	65	25	33.64	182.81±3.20	15.698±1.03	59.46±1.87

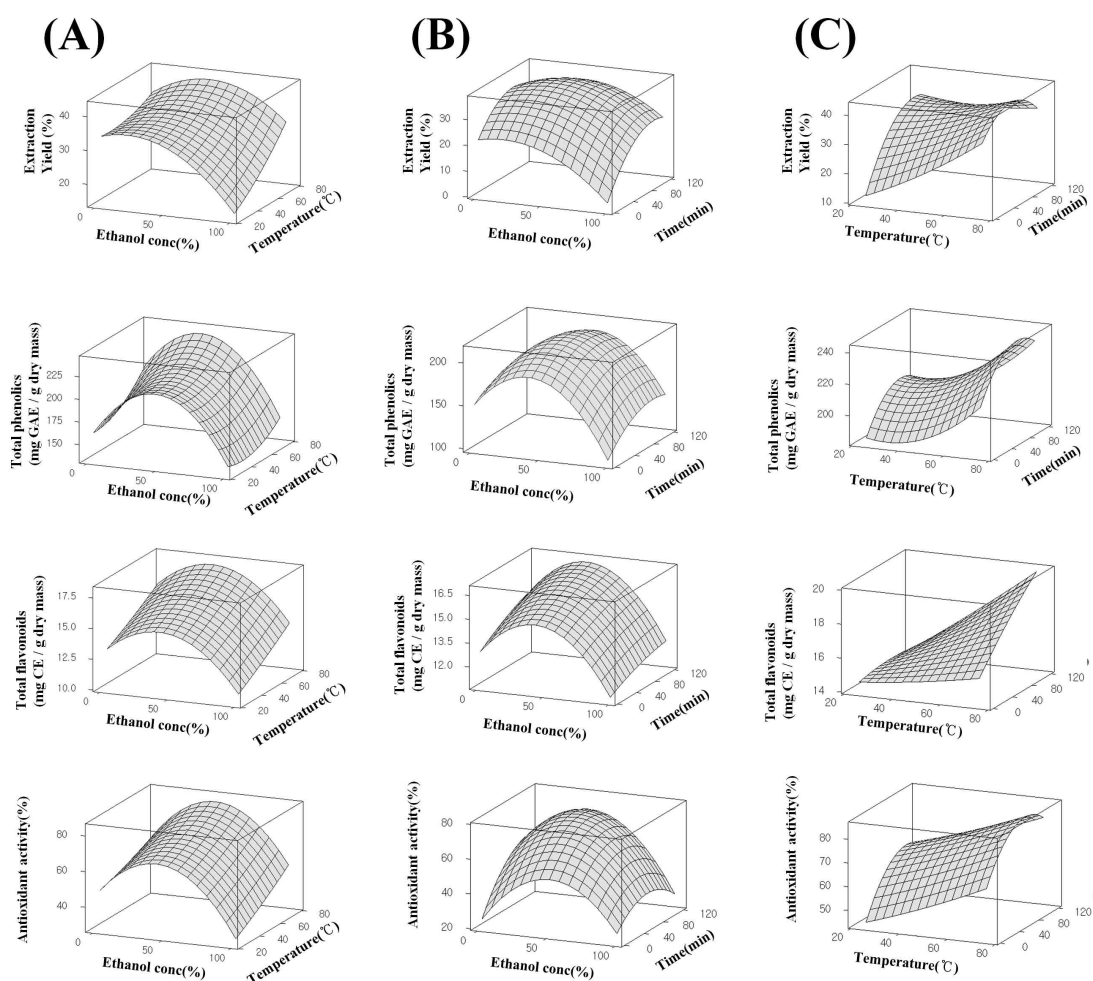


Fig 8. Response surface plots for extraction yield, TPC, TFC, and antioxidant activities(DPPH radical scavenging). (A) Interaction of ethanol concentration and extraction temperature; (B) Interaction of ethanol concentration and extraction time; (C) Interaction of extraction temperature and extraction time.

바. 회귀분석 반응모형식

(1) 반응표면분석에 의하여 각 항목의 측정결과를 바탕으로 회귀분석 반응모형식에 대입하여 반응모형식을 세우고 각 독립변수에 대하여 0.813, 0.866, 0.740, 0.933의 R^2 값을 얻음.

Table 3. The fitted model for extraction yield(Y_1), total phenolic contents(Y_2), total flavonoids contents(Y_3) and total antioxidant activities(Y_4) in coded variables

Response s	Polynomial equation	R^2
Y_1	$Y = -3.828X_1^{**2}) + 3.920X_2^{*3}) + 4.243X_3^{***1}) - 2.676X_1^{2**} + 0.956X_2^{2†} - 2.699X_3^{2**} + 1.657X_1X_2^{†4}) + 1.078X_1X_3^{†} - 2.677X_2X_3^{†} + 34.722$	0.813
Y_2	$Y = -8.734X_1^{**} + 8.668X_2^{†} + 5.471X_3^{†} - 21.083X_1^{2***} + 6.849X_2^{2†} - 5.595X_3^{2†} - 2.472X_1X_2^{†} + 3.199X_1X_3^{†} + 0.635X_2X_3^{†} + 211.486$	0.866
Y_3	$Y = -0.681X_1^{*} + 1.199X_2^{**} + 0.523X_3^{†} - 1.036X_1^{2***} + 0.060X_2^{2†} - 0.074X_3^{2†} + 0.054X_1X_2^{†} - 0.058X_1X_3^{†} + 0.493X_2X_3^{†} + 15.964$	0.740
Y_4	$Y = -4.255X_1^{***} + 6.991X_2^{***} + 5.153X_3^{***} - 9.429X_1^{2***} + 0.584X_2^{2†} - 3.957X_3^{2***} + 1.262X_1X_2^{†} - 2.566X_1X_3^{†} - 0.362X_2X_3^{†} + 71.800$	0.933

- 1) *** : p-level < 0.01
- 2) ** : p-level < 0.05
- 3) * : p-level < 0.1
- 4) † : p-level > 0.1

사. 반응모형식의 계수와 유의성

(1) 고형분 추출에서 반응 모형식의 ANOVA 분석 결과 모델식이 통계적 유의성이 있었고, 고형분 함량은 X_3 (time)가 가장 큰 영향을 주는 변수로 나타남($p < 0.01$, 회기계수 = 4.243). 총 폴리페놀 추출의 모델식은 통계적 유의성이 있었고, X_1 (에탄올 농도)가 가장 큰 변수로 작용($p < 0.01$, 회기계수 = -21.083) 하였으며, 플라보노이드 추출도 폴리페놀 추출과 유사하게 X_1 (에탄올 농도)가 가장 큰 변수로 작용하였음($p < 0.01$, 회기계수 = -1.036). 항산화 능력에서는 모든 변수가 유의성이 있고, 유사한 수준으로 작용하였음.

Table 4. Analysis of variance for response of dependent variables (Y_1, Y_2, Y_3 and Y_4)

Response s	Source	DF	SS	MS	F-value e	p-value
Y_1	Model	9	741.94	82.438	4.84	0.011

	Linear	3	482.07	152.570	8.96	0.003
	Quadratic	3	205.99	68.665	4.03	0.041
	Cross-product	3	53.88	17.960	1.05	0.411
	Residual	10	170.30	17.030		
	Lack of fit	5	156.88	31.376	11.69	0.009
	Pure error	5	13.42	2.684		
	Total	19	912.24			
Y_2	Model	9	10096.7	1121.86	7.15	0.002
	Linear	3	2747.7	541.08	3.45	0.060
	Quadratic	3	7237.8	2412.61	15.38	0.000
	Cross-product	3	111.2	37.05	0.24	0.869
	Residual	10	1568.5	156.85		
	Lack of fit	5	1419.5	283.90	9.53	0.014
	Pure error	5	149.0	29.79		
	Total	19	11665.2			
Y_3	Model	9	40.453	4.495	3.15	0.044
	Linear	3	23.343	5.385	3.78	0.048
	Quadratic	3	15.976	5.325	3.24	0.049
	Cross-product	3	1.134	0.378	0.27	0.849
	Residual	10	14.249	1.425		
	Lack of fit	5	13.571	2.714	20.00	0.003
	Pure error	5	0.679	0.136		
	Total	19	54.702			
Y_4	Model	9	2494.75	277.19	15.43	0.000
	Linear	3	967.98	258.14	14.37	0.001
	Quadratic	3	1466.33	488.78	27.21	0.000
	Cross-product	3	60.44	20.15	1.12	0.386
	Residual	10	179.66	17.79		
	Lack of fit	5	98.90	19.78	1.22	0.415
	Pure error	5	80.76	16.15		
	Total	19	2674.41			

아. 예상 최적조건

- (1) 반응표면 분석을 통한 예상 최적조건 설정은 다음과 같이 각 독립변수에 따라 각기 다른 최적조건을 나타내며, 고형분 함량, 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, 항산화능에 대한 최적 추출 조건을 얻음.
- (2) 최적 추출 조건을 이용하여 확인 실험을 진행한 결과 예상 결과값과 유사한 결과를 얻을 수 있었음. 따라서 반응표면분석법 모델식이 백장미 유효성분 추출에 적절하게 적용될 수 있음을 확인함.

(3) 최적 추출 조건은 추출수율, 폴리페놀, 플라보노이드, 항산화능 등을 고려하여 에탄올 농도 41 %, 추출온도 75 °C로 정하였음. 추출시간은 변수별로 다른 결과를 나타내었으나 기능성 성분으로 추측되는 폴리페놀 추출조건에 맞추어 80.89분으로 정하였음.

Table 5. Predicted values and experimental values of response variables in optimal conditions of white rose petals extract.

Responses	Independent variables	Optimal conditions	Predicted values	Experimental values
Y_1 (%)	EtOH conc(%)	42.02		
	Extraction temperature(°C)	75.00	42.92	40.17
	Extraction time(min)	60.72		
Y_2 (mg GAE/g dry mass)	EtOH conc(%)	42.02		
	Extraction temperature(°C)	75.00	243.54	246.30
	Extraction time(min)	80.89		
Y_3 (mg CE /g dry mass)	EtOH conc(%)	41.03		
	Extraction temperature(°C)	75.00	19.93	23.69
	Extraction time(min)	119.00		
Y_4 (%)	EtOH conc(%)	41.03		
	Extraction temperature(°C)	75.00	85.74	82.37
	Extraction time(min)	89.41		

3. 열수 추출법 최적 조건 확립

가. 실험방법

(1) 열수 추출에 있어 추출효율에 영향을 줄 수 있는 인자는 pH, 온도, 샘플 입자 크기, 추출 시간 등이 있으며, 온도는 90 °C에서 고정하여 실험을 진행하였음.

나. pH 조건별 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 가수비 1:25, 추출온도 90 °C, 추출시간 1 hr로 고정하였고, 추출 pH는 3~9의 조건으로 추출하였음. 추출 실험 결과 pH 7.0에서 가장 높은 229.5 mg GAE/ g dry mass의 총 폴리페놀 함량이 측정됨(Fig. 9).

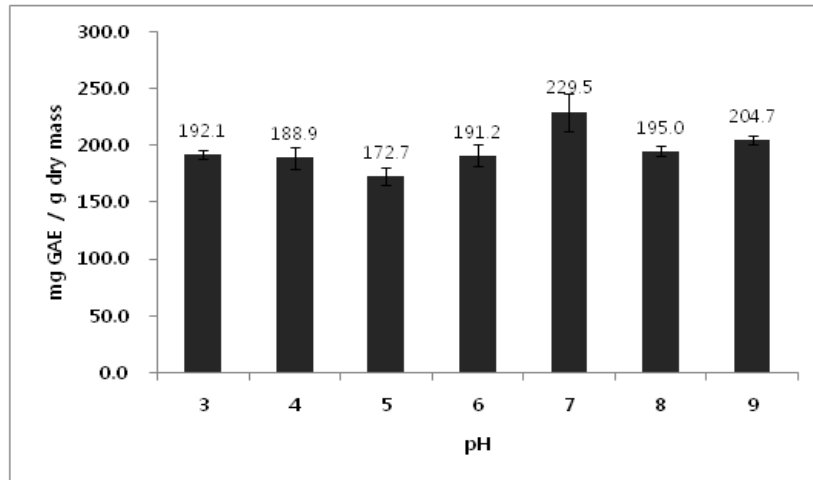


Fig 9. Effect of pH of on total polyphenol contents of white rose extract.

다. 샘플 입자 크기별 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 가수비 1:25, 추출온도 90 °C, 추출시간 1 hr으로 고정하였고, 백장미 꽃잎입자 크기별 추출효율을 측정하였음. 백장미꽃잎 원물과 10mesh를 통과한 샘플의 폴리페놀 함량 차이는 크기 않았으나, 14 mesh와 30 mesh를 통과한 샘플은 폴리페놀 추출 효율이 향상되었음(Fig. 10.).

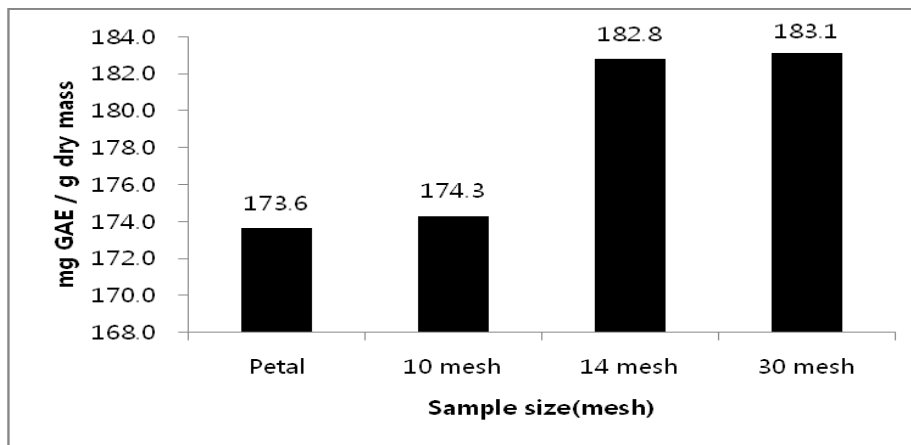


Fig 10. Effect of sample size of hot water on total polyphenol contents of WRPE

라. 추출 시간별 총 폴리페놀 함량 측정

(1) 2시간 추출 시 가장 높은 함량의 총 폴리페놀이 추출되었고, 3 시간 추출 시는 추출된 총 폴리페놀 함량이 감소하는 경향을 보임. 이는 장시간 추출 시 열에 의해 분해된 폴리페놀이 많은 것으로 분석됨에 따라 최적 추출시간은 2시간으로 볼 수 있음(Fig. 11.).

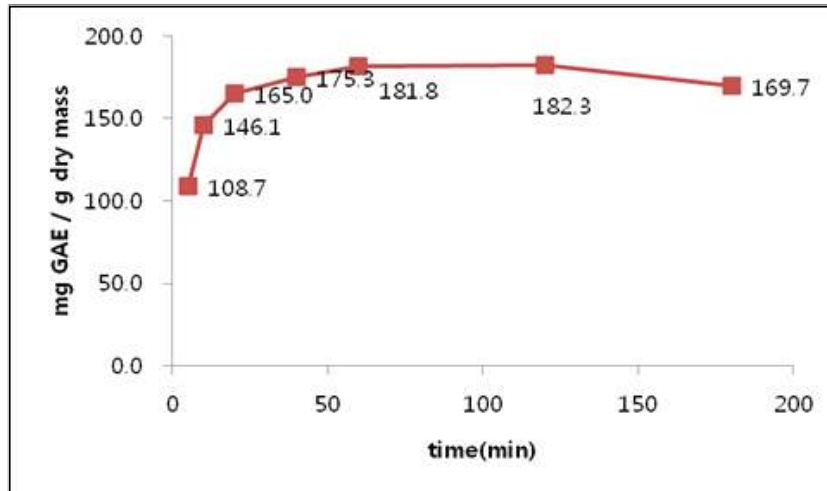


Fig 11. Effect of extraction time on total polyphenol contents of WRPE

마. 추출 시간별 총 플라보노이드 함량 측정

(1) 총 플라보노이드 함량은 2 시간 추출 시 가장 높은 함량으로 추출되었고, 폴리페놀 분석결과와 동일하게 3 시간 추출 시는 함량이 감소하는 경향을 보임. 따라서 2 시간 추출을 최적조건이라 볼 수 있음.

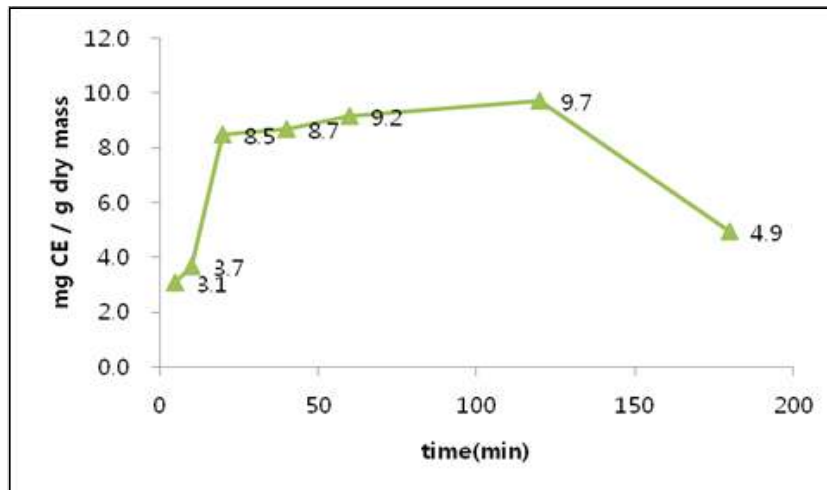


Fig 12. Effect of extraction time on total flavonoid contents of WRPE

바. 추출 시간별 항산화능(DPPH scavenging) 측정

(1) 추출 시간별 항산화능 평가 결과 120 분 추출 시 항산화능이 가장 뛰어난 것으로 나타났으며, 180 분 추출 시에는 총 폴리페놀 함량이 줄어든 것과 동일한 양상으로 항산화능 역시 감소되는 경향을 보임(Fig. 13.).

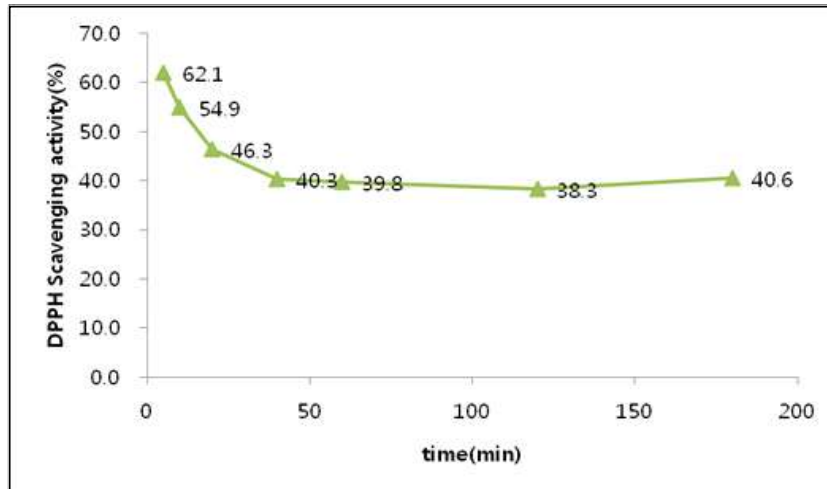


Fig 13. Effect of extraction time on DPPH scavenging activity of WRPE

사. 최적조건

- (1) 열수 추출실험에서 pH조건별 실험결과 중성인 pH 7.0에서 추출효율이 가장 좋았음.
- (2) 백장미 꽃잎 입자 크기별 추출조건에서는 14 mesh(182.8 mg GAE / g) 와 30 mesh(183.1 mg GAE / g)가 가장 좋았으나 경제성을 고려하여 14 mesh로 선정하였음.
- (3) 시간별 추출실험 결과 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드, 항산화능 평가에서 모두 2 시간 추출시 가장 추출 효율이 뛰어났음.

3절 백장미 추출물의 성분 분리 동정 및 지표물질 선정

1. 백장미 추출물의 성분 분석

가. 일반성분 및 비타민류 분석

- (1) 일반성분은 수분, 조단백, 조지방, 회분을 분석하였음. 수분과 회분의 함량은 식품공전법(Korean Food Code)의 105 °C 상압건조 가열법과 전기회화로(Electrical muffle furnace)이용한 회화법을 사용하여 질량감소분을 측정하여 정량. 조단백 및 조지방은 AOAC방법을 사용하여 FOSS KJELTEC AUTO 8400 SYSTEM과 FOSS SOXTEC AVANTI 2050을 사용하여 정량하였으며, 조단백 분석시 질소환산계수는 6.25를 사용하였음. 그 결과는 Table 6과 같음.
- (2) 수용성 비타민 B2, B6, C 분석은 식품공전법(Korean Food Code)을 사용하였고 지용성 비타민 A, E정량에는 AOAC 분석법을 사용하였음. 비타민 분석결과는 Table 7과 같음.

Table 6. Proximate composition of White rose petal

(g / 100 g)

Samples	Moisture	Protein	Lipid	Ash
RAW	10.5	10.136	1.919	4.254
Extract with EtOH	11.2	4.038	0.613	4.082

Table 7. Vitamin composition of White rose petal.

(mg / kg)

Samples	Vit. A	Vit. B ₂	Vit. B ₆	Vit. C	Vit. E
RAW	ND	1.62	23.71	37.42	163.44
Extract with EtOH	ND	2.28	ND	ND	ND

나. 추출방법별 폴리페놀성분 분석

(1) 백장미 추출물의 기능성분 분석은 HPLC 분석을 통하여 진행하였으며, 추출방법별 추출물 분석, 가수분해물 분석 및 prep-HPLC fraction 및 EtOH 추출물에 대한 fraction 분석 진행.

(가) HPLC 분석조건

- ① Mobile phase A : ACN/0.1 % Trifluoroacetic acid in H₂O(18:82)
 B : ACN/0.1 % Trifluoroacetic acid in H₂O(35:65)
 C : ACN/0.1 % Trifluoroacetic acid in H₂O(80:20)

- ② Temperature : 25 °C
- ③ Flow rate : 1 ml/min
- ④ Column Eclipse XDB-C18(4.6×250 mm),Agilent
- ⑤ Detector UV detector 265 nm
- ⑥ Gradient elution profile

Time	A%	B%	C%
0	100	0	0
15	0	100	0
25	0	100	0
30	0	0	100
35	0	0	100
40	100	0	0

(2) 추출물의 폴리페놀 성분을 확인하기 위해 식물성분 및 장미 성분에 함유 되어있다고 알려진 성분의 표준 물질(standard) 14종의 분석 진행. gallic acid (RT: 3.6), catechin (RT: 5.4 min), rutin (RT: 8.2 min), astragalín (RT: 11min), quercitrín (RT: 11.4 min), myricetin (RT: 14.1 min), quercetin (RT: 18.78 min), kaempferol (RT: 24.86 min)등 확인(Fig. 14).

(3) Ethanol, Hot water, HTHP, Enzyme 추출물의 폴리페놀 성분을 정성분석 진행하여 표준물질과 머무름 시간(RT) 및 UV 스펙트럼(Fig. 22~23.)이 일치하는 gallic acid, astragalín, kaempferol성분의 피크를 확인함(Table. 8.). kaempferol은 Ethanol 추출물에서만 확인되어 열수보다는 Ethanol에서 잘 추출되는 것으로 보임.

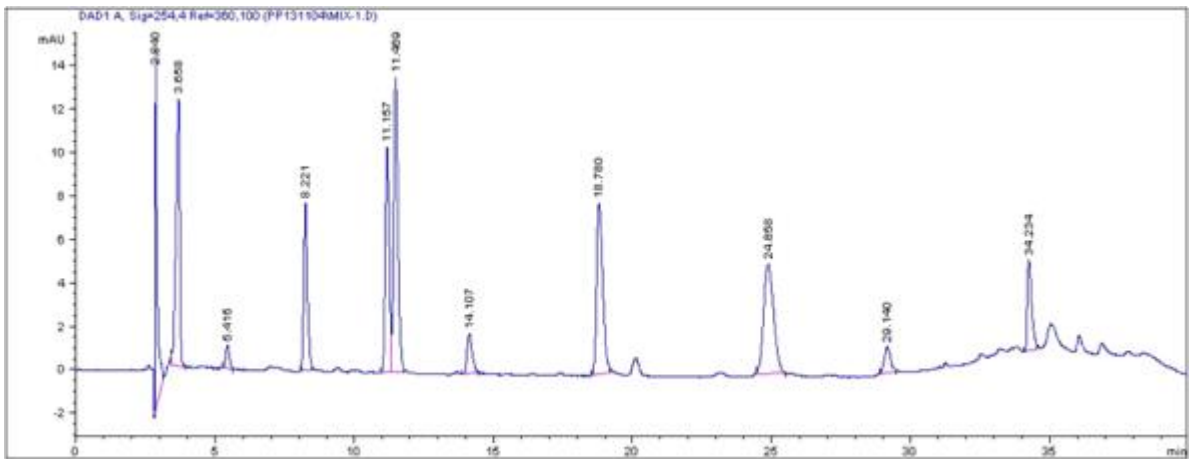
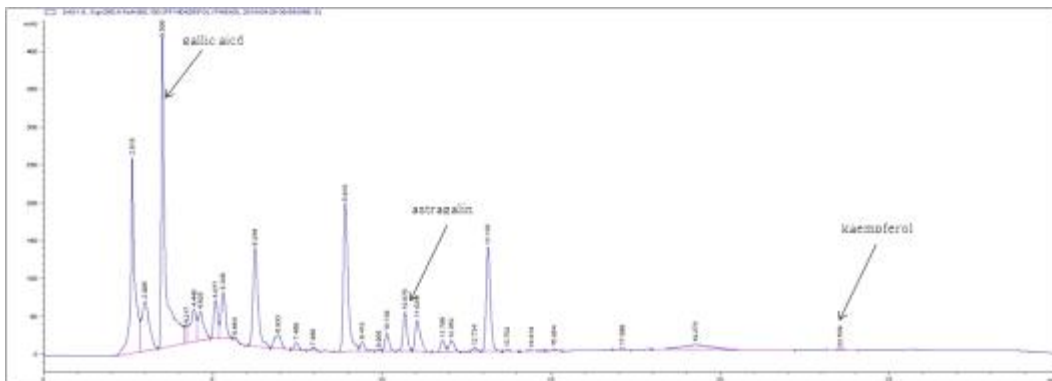
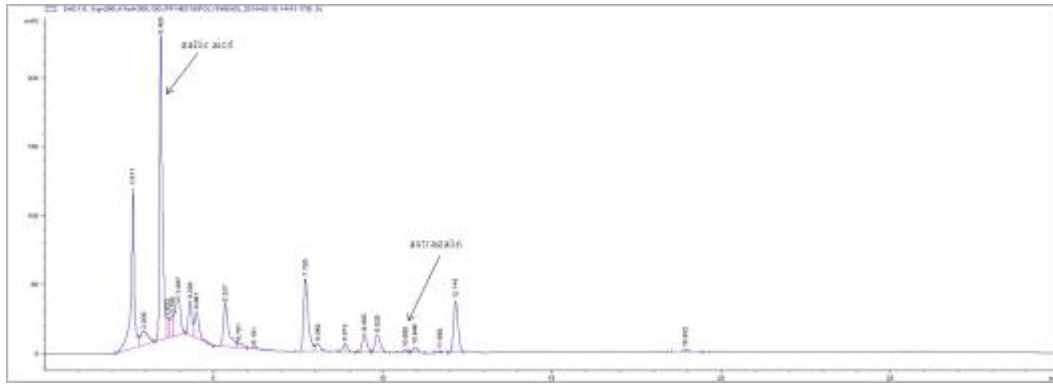


Fig 14. HPLC spectra of various standard materials which common occurring polyphenols in plants including gallic acid, catechin, rutin, astragalín, quercitrín, myricetin, quercetin, kaempferol

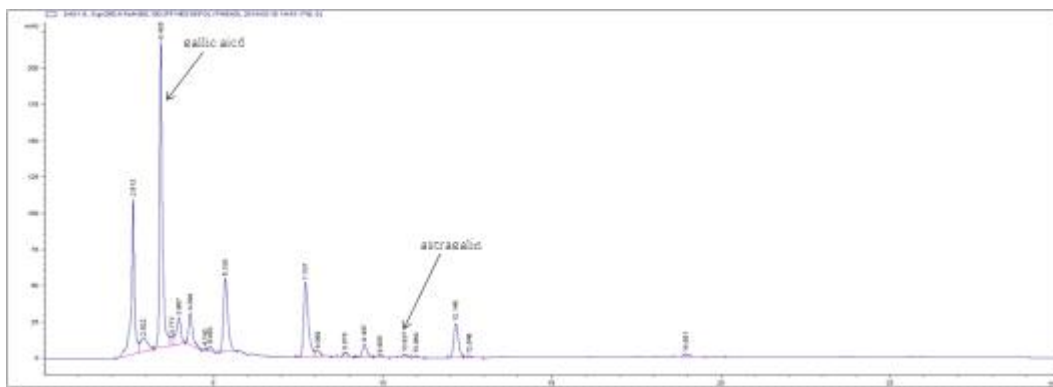
A)



B)



C)



D)

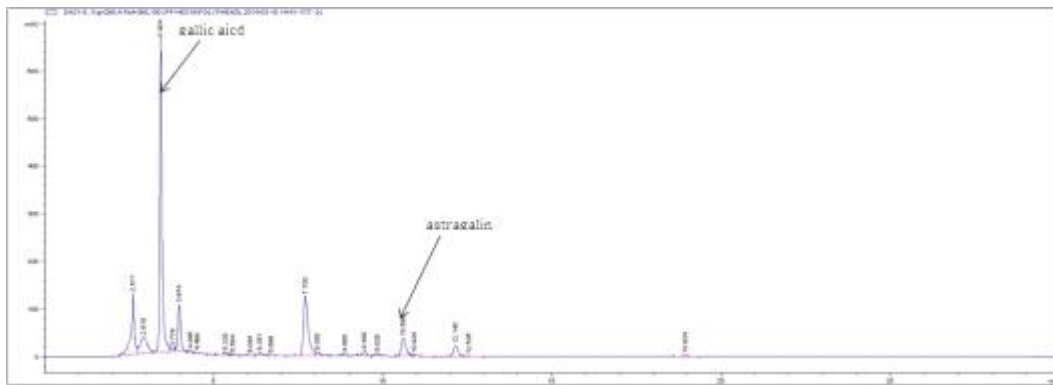


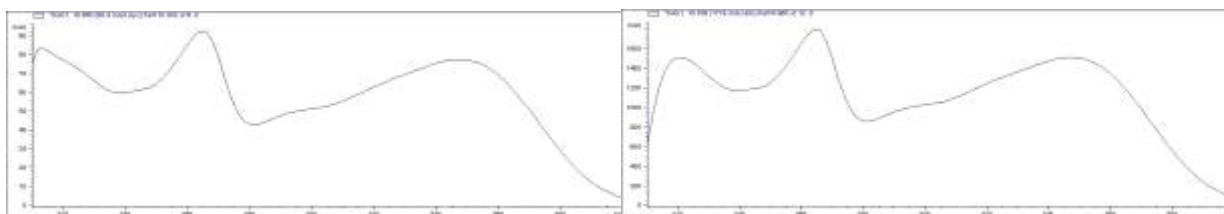
Fig 15. Comparison of four extraction methods for the extraction of polyphenols from WRPE

A: EtOH, B: Enzyme, C: Hot water, D: HTHP.

Table 8. Comparison of polyphenols occurring in various white rose extract.
 ND=not detected

Compounds	Ethanol extract	Hot water extract	HTHP extract	Enzyme extract
gallic acid	Detected	Detected	Detected	Detected
catechin	ND	ND	ND	ND
rutin	ND	ND	ND	ND
astragalin	Detected	Detected	Detected	Detected
quercitrin	ND	ND	ND	ND
myricetin	ND	ND	ND	ND
quercetin	ND	ND	ND	ND
apigenin	ND	ND	ND	ND
hispidulin	ND	ND	ND	ND
heperetin	ND	ND	ND	ND
methyl gallate	ND	ND	ND	ND
morin	ND	ND	ND	ND
ellagic acid	ND	ND	ND	ND
kaempferol	Detected	ND	ND	ND

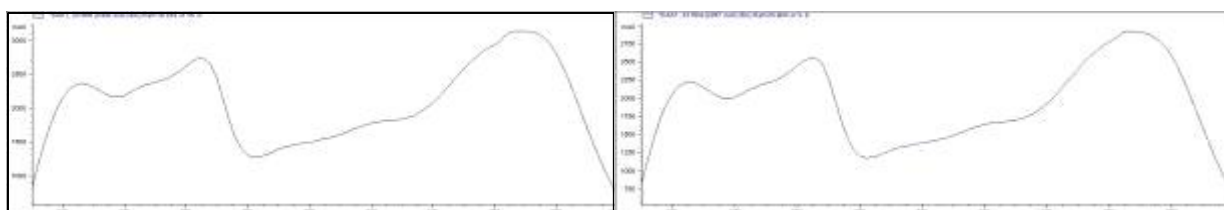
A)



B)

EtOH extract

Standard



C)

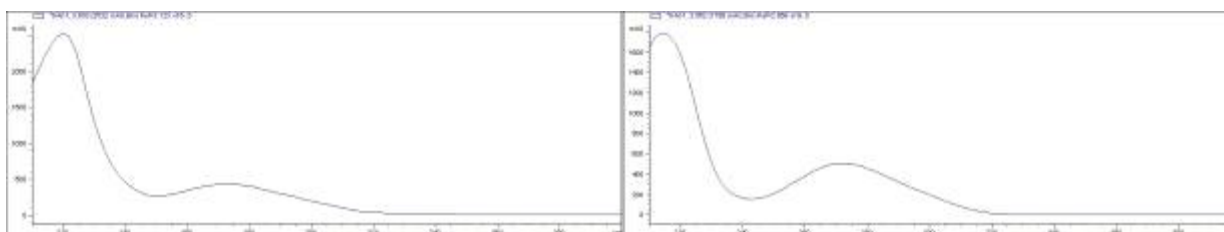


Fig 16. Comparison of HPLC spectra of EtOH extract with standard
 A: astragalin, B: kaempferol, C: gallic acid

2. 백장미 추출물의 성분 동정 및 지표 물질 선정

가. 백장미 꽃잎 추출 및 용매분획

(1) 시료의 추출 및 분획

(가) 건조된 백장미 꽃잎 100 g을 곱게 파쇄한 후 1 L의 80 % 에탄올에 침지하여 실온에서 24 시간 주기로 3 일 동안 추출 후 확보하였음. 에탄올 추출물은 Whatman Grade No.1 filter paper(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과하였으며, 증발기 (evaporator)를 이용하여 용매를 증발 시킨 시료를 실험에 사용하였음. 또한, 에탄올 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol, water를 사용하여 연속적으로 분획하였으며, 각각의 분획물 역시 증발기를 이용하여 용매를 증발시킨 뒤 최종 시료로 사용하였음.

(2) 지표물질 분석을 위한 추출물 및 분획물 확보

(가) 백장미 꽃잎 100 g을 80 % 에탄올 1 L를 이용하여 추출한 결과 24.5 g의 에탄올 추출물을 확보하였으며, 이를 5가지 용매로 분획하여 각각의 yield를 확인하였다. 각 분획물 중 물 분획물이 17.3 g으로 상대적으로 가장 높은 yield를 나타내었으며, 에틸아세테이트 3.0 g, *n*-Butanol 2.7 g, *n*-Hexane 1.2 g 순으로 확인되었고, 클로로포름 분획물 (0.2 g)이 가장 적은 yield를 보였다 (Fig. 17).

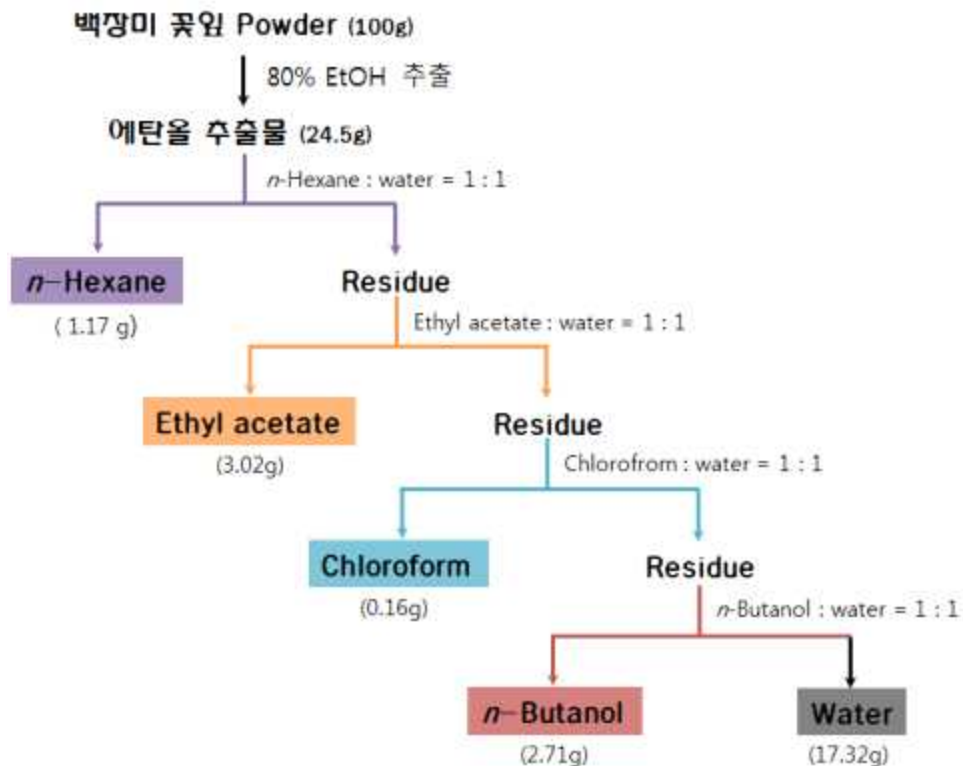


Fig 17. Tree diagram of the Ethanol extracts and fractions from white rose petal.

나. 1차 biological activity screening

(1) DPPH radical 소거능

(가) 백장미 꽃의 지표물질 사전분석을 위해 에탄올 추출물 및 각 분획물을 각각 100 μg 의 농도부터 serial dilution으로 처리 후 DPPH 활성산소 소거능을 측정한 결과 모든 sample에서 DPPH 활성산소 소거능이 관찰되었다. Hexane과 CHCl_3 분획물의 경우 각각 12.5, 25 μg 의 농도에서 소거능이 확인된 반면, EA와 BuOH 분획물에는 최저 농도인 1.5 μg 에서도 유의한 소거능이 관찰되었음(Fig. 18).

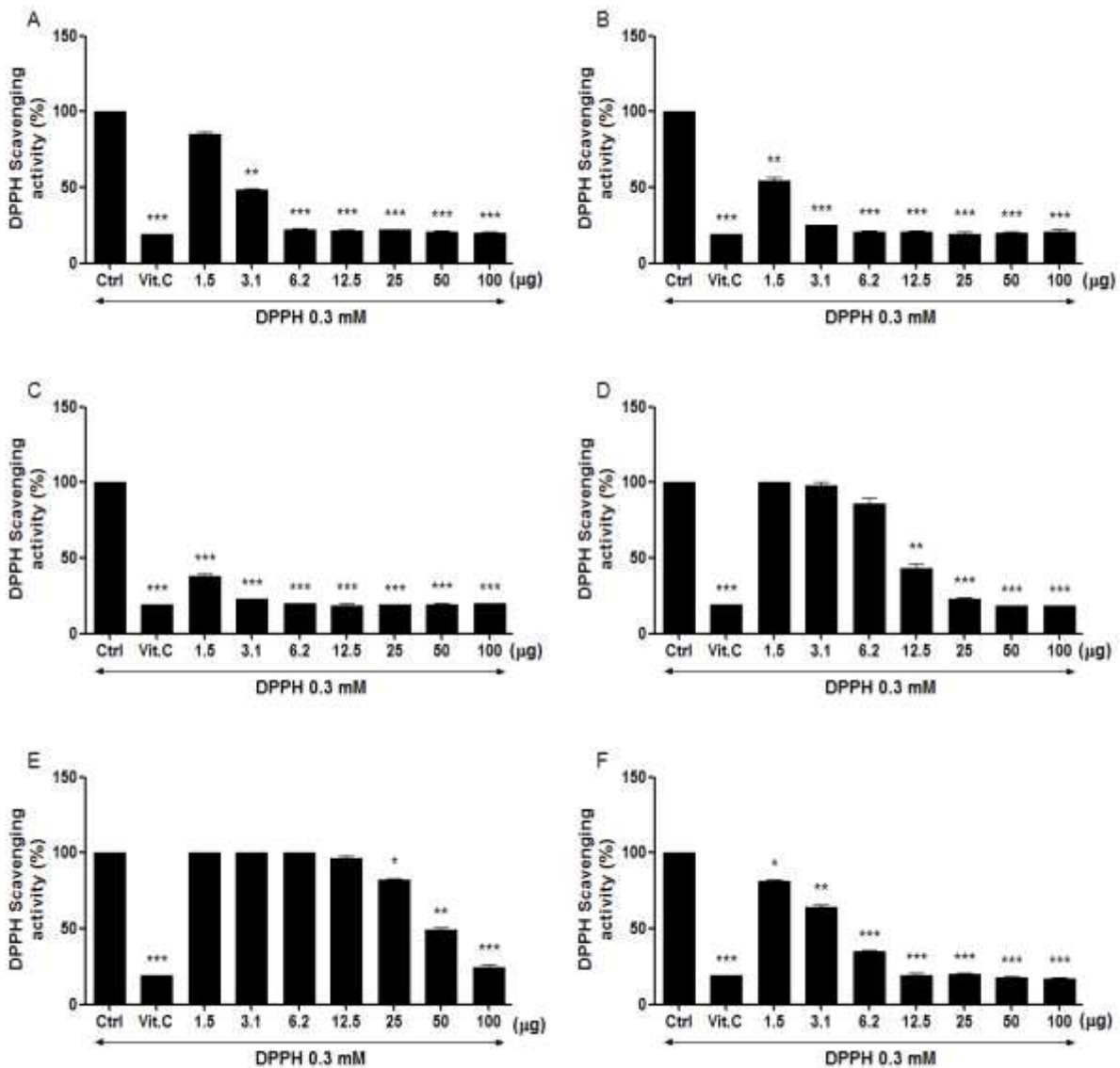


Fig 18. DPPH-scavenging activities of white rose extracts.
(A. EtOH, B. BuOH, C. EA, D. HEX, E. CHCl_3 , F. H_2O).

(2) 금속이온 촉매 산화억제효과

(가) 백장미 꽃 시험물질을 각각 100 μg 의 농도부터 serial dilution으로 처리 후 protein

degradation 보호효과를 관찰한 결과 CHCl₃ 분획물을 제외한 모든 sample에서 최저 처리 농도인 3.1 μg까지 유의한 효과를 확인하여 대부분의 분획물이 라디칼 공격으로부터 단백질을 보호하는 효능이 있는 것으로 확인되었음(Fig. 19).

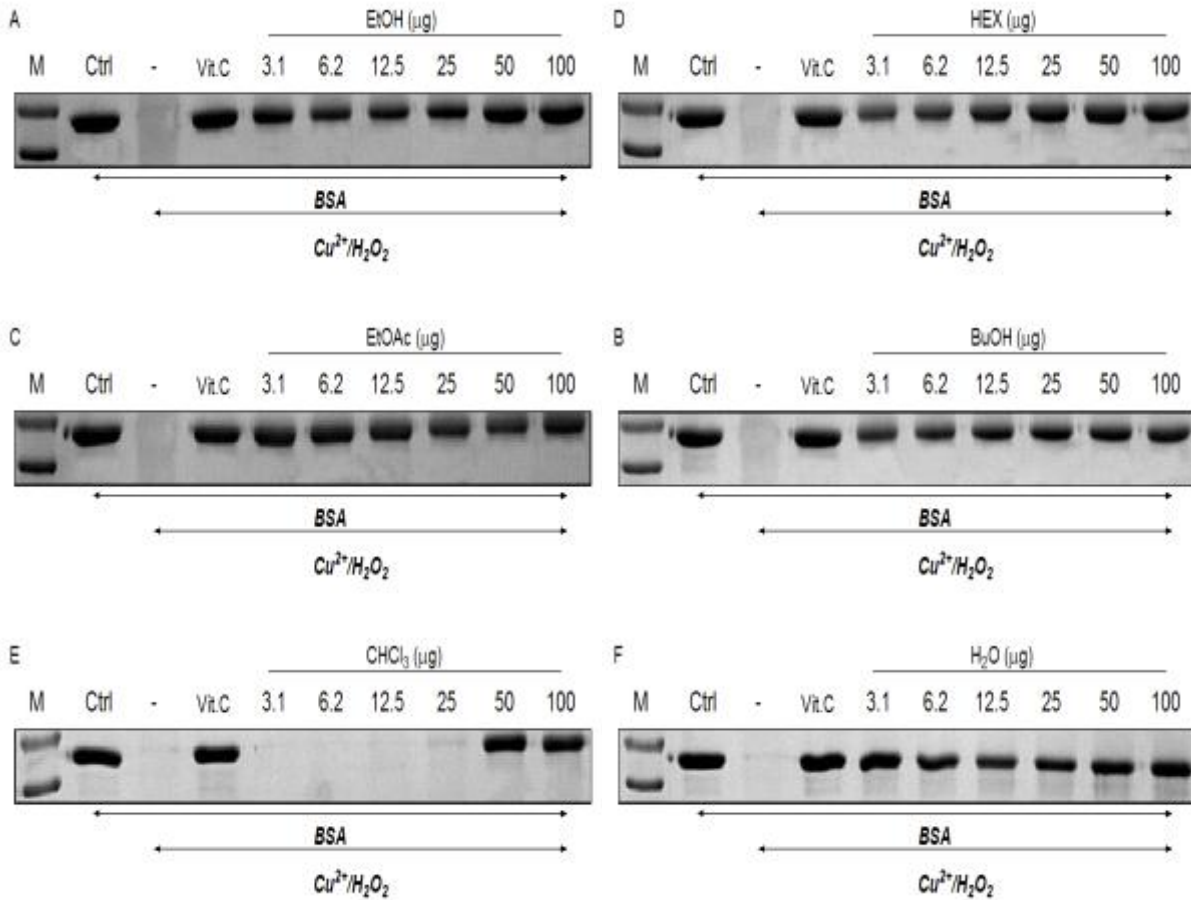


Fig 19. Protein degradation assay of white rose extracts.
(A. EtOH, B. BuOH, C. EA, D. HEX, E. CHCl₃, F. H₂O).

(3) Tyrosinase 저해 효과

(가) 고농도의 양성대조군(Vit.C 500 μm) 이상의 효능을 보이는 시험물질의 농도를 확인하기 위해 백장미 꽃 추출물 및 분획물을 각각 500 μg부터 serial dilution으로 처리 후 tyrosinase 활성 저해 능력을 측정된 결과 모든 시험물질에서 tyrosinase 활성 저해 능력이 관찰되었음. Hexane 및 CHCl₃ 분획물은 다른 분획물에 비해 상대적으로 낮은 저해능을 보인 반면 H₂O 분획물의 경우 고농도에서 저해능이 있는 것으로 확인되었음. 반면 EtOH 추출물(IC₅₀=28.1 μg) 및 BuOH(IC₅₀=43.6 μg), EA(IC₅₀=49.2 μg) 분획물에서는 효과적인 tyrosinase 저해활성이 있는 것으로 관찰되었음. (Fig. 20).

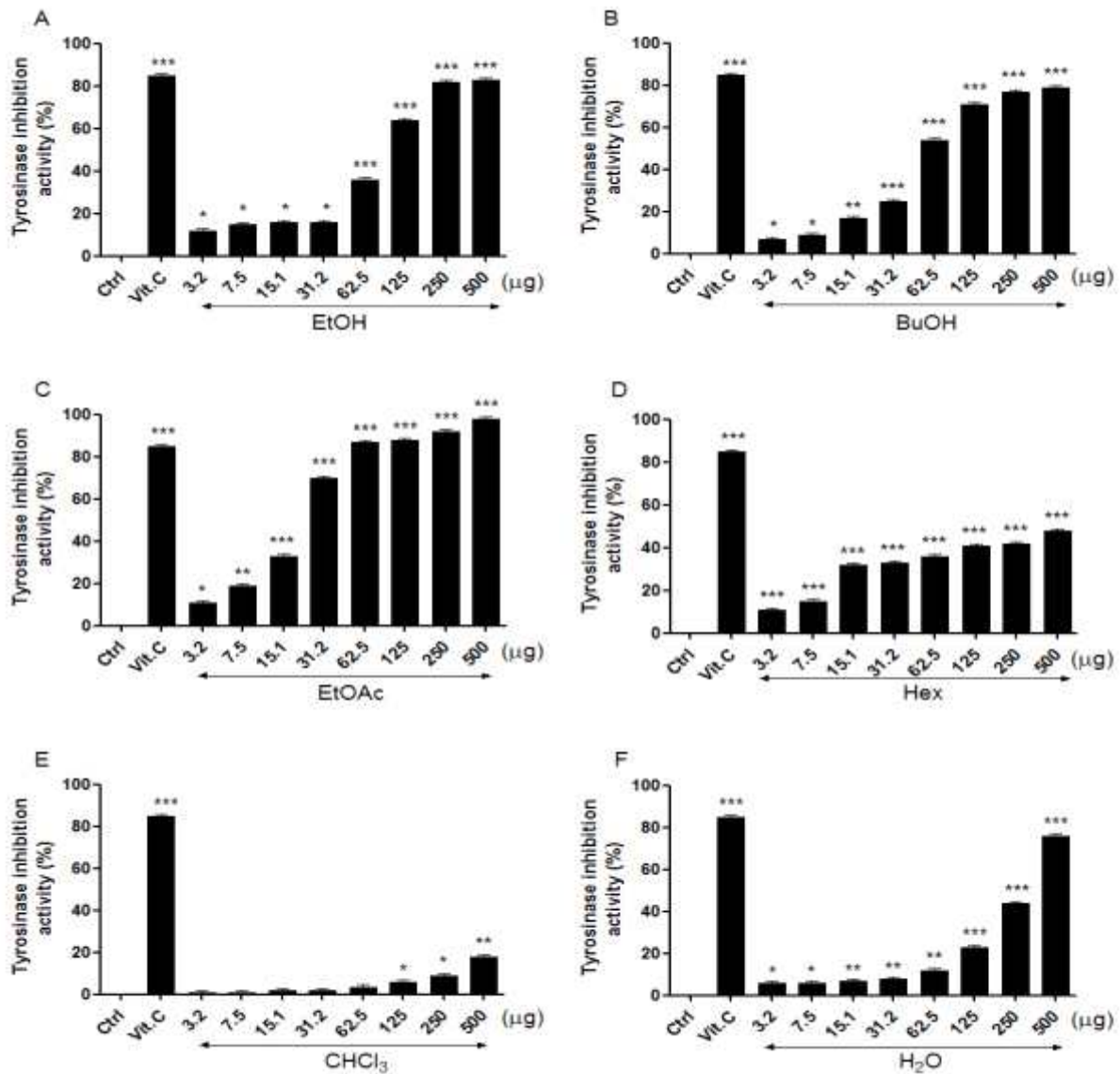


Fig 20. Tyrosinase inhibition activity of white rose extracts.

(A. EtOH, B. BuOH, C. EA, D. HEX, E. CHCl₃, F. H₂O).

(4) MMP-1 저해 효과

(가) 백장미 꽃잎 추출물 및 분획물에 대한 MMP-1 저해 효과를 확인한 결과 EtOH, BuOH, H₂O 분획물에서 상대적으로 높은 효능이 관찰되었으며, EA 분획물에서도 25 µg을 제외한 농도에서 저해능이 확인되었음. (Fig. 21).

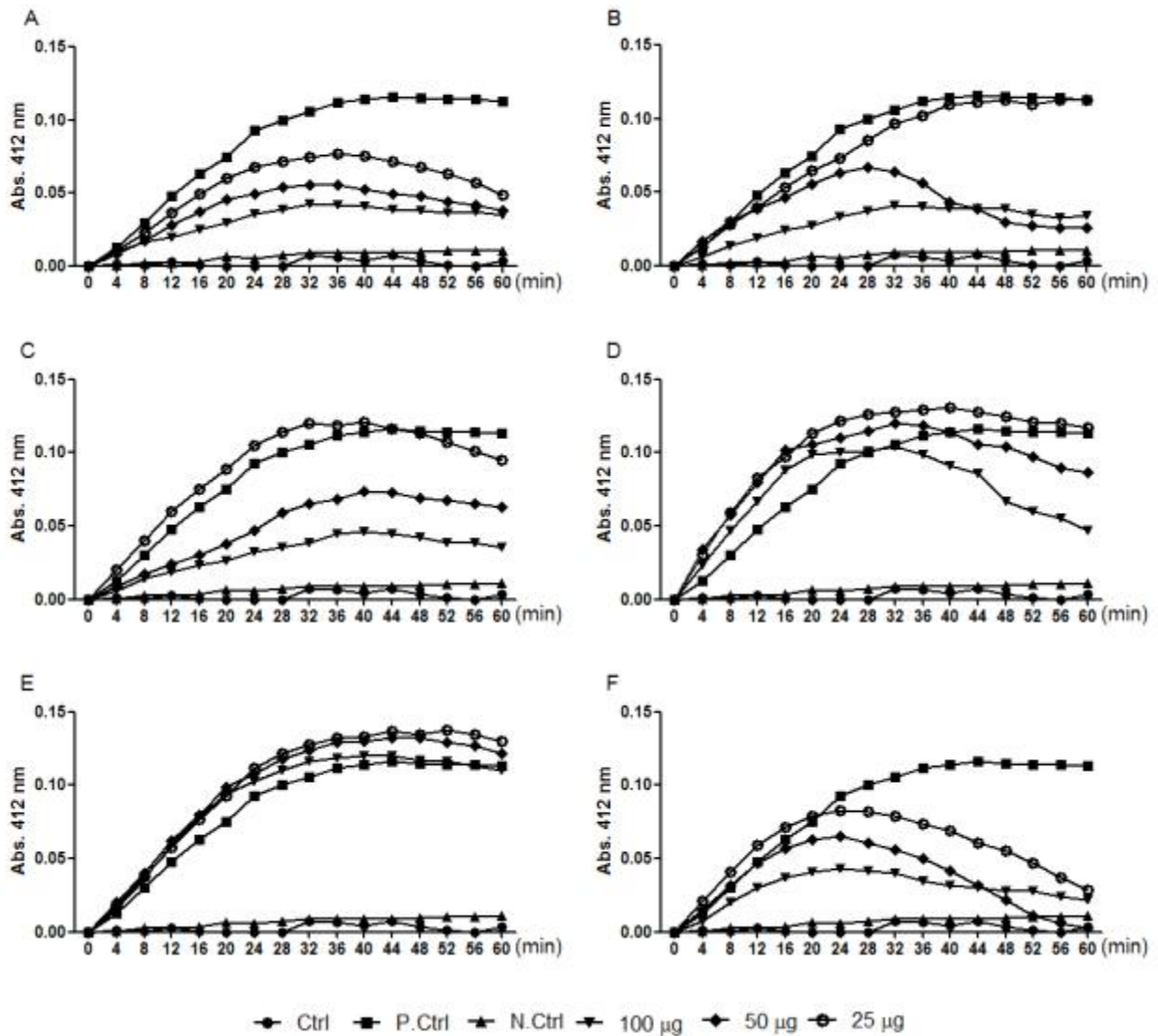


Fig 21. Inhibition of MMP-1 by white rose extracts.
 (A. EtOH, B. BuOH, C. EA, D. HEX, E. CHCl₃, F. H₂O).

(5) 총 페놀성화합물 분석

(가) 식물계에 널리 분포하고 있는 페놀 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가지는 2차 대사산물로 높은 항산화 활성과 항암 및 항균 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 이를 이용한 천연 항산화제에 대한 연구가 진행되고 있다. 이에 백장미 꽃 추출물 및 분획물(에탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부탄올, 물)에 함유되어 있는 총 페놀 화합물의 양을 분석하였음.

(나) 총 페놀성화합물 분석 결과 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물에서 가장 많은 페놀성 화합물이 함유되어있는 것으로 확인하였음(Fig., 24). 이를 단위 무게 당 함유량으로 정량적 분석을 수행한 결과 에틸아세테이트 분획물에 함유되어 있는 총 페놀성화합물은 593.4±37.7 mg/g으로 가장 많은 양이 포함되어 있는 것으로 나타났으며, 부탄올 분획물에는 295.9±34.1 mg/g이 포함되어 있음. 이는 최초 에탄올 추출물

(163.2±9.6 mg/g)과 비교했을 때 약 3.6배 및 1.8배에 해당하는 양이다. 따라서 추출물 및 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 항산화 효과를 가질 것으로 판단되어, 2차 활성 연구 및 fractionation 대상 분획물로 적합한 것으로 사료됨.

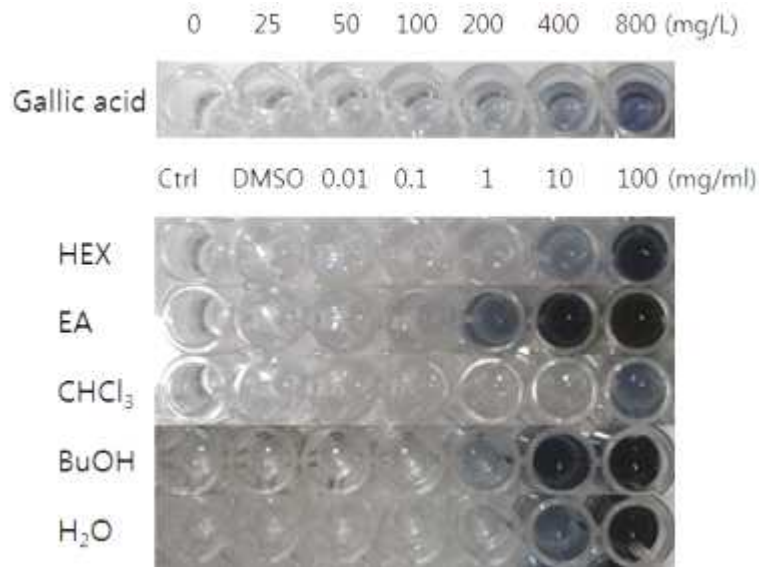


Fig 22. Total phenolic content of white rose petal extracts (HEX: Hexane, EA: Ethyl acetate, CHCl₃: Chloroform, BuOH: Butanol, H₂O: Water).

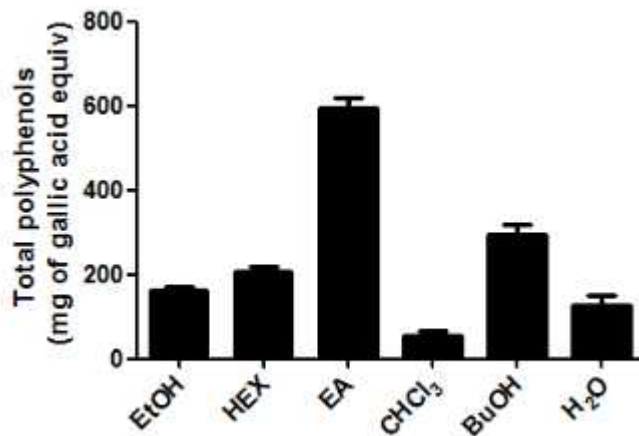


Fig 23. Total phenolic content of white rose petal extracts (HEX: Hexane, EA: Ethyl acetate, CHCl₃: Chloroform, BuOH: Butanol, H₂O: Water).

(6) 세포활성도 분석(Cell viability assay, Cell counting kit-8)

(가) 백장미 꽃잎 추출물 및 분획물에 대한 세포 활성 정도를 확인하기 위해 Raw264.7 세포주에 각 시험물질을 100 µg/mL의 농도부터 serial dilution으로 처리 한 결과 control과 대조 했을 때 EtOH 추출물 및 BuOH, EA 분획물 고농도에서 세포활성저해가 관찰되어 세포독성이 비교적 낮은 것으로 사료되었다 (Fig. 24).

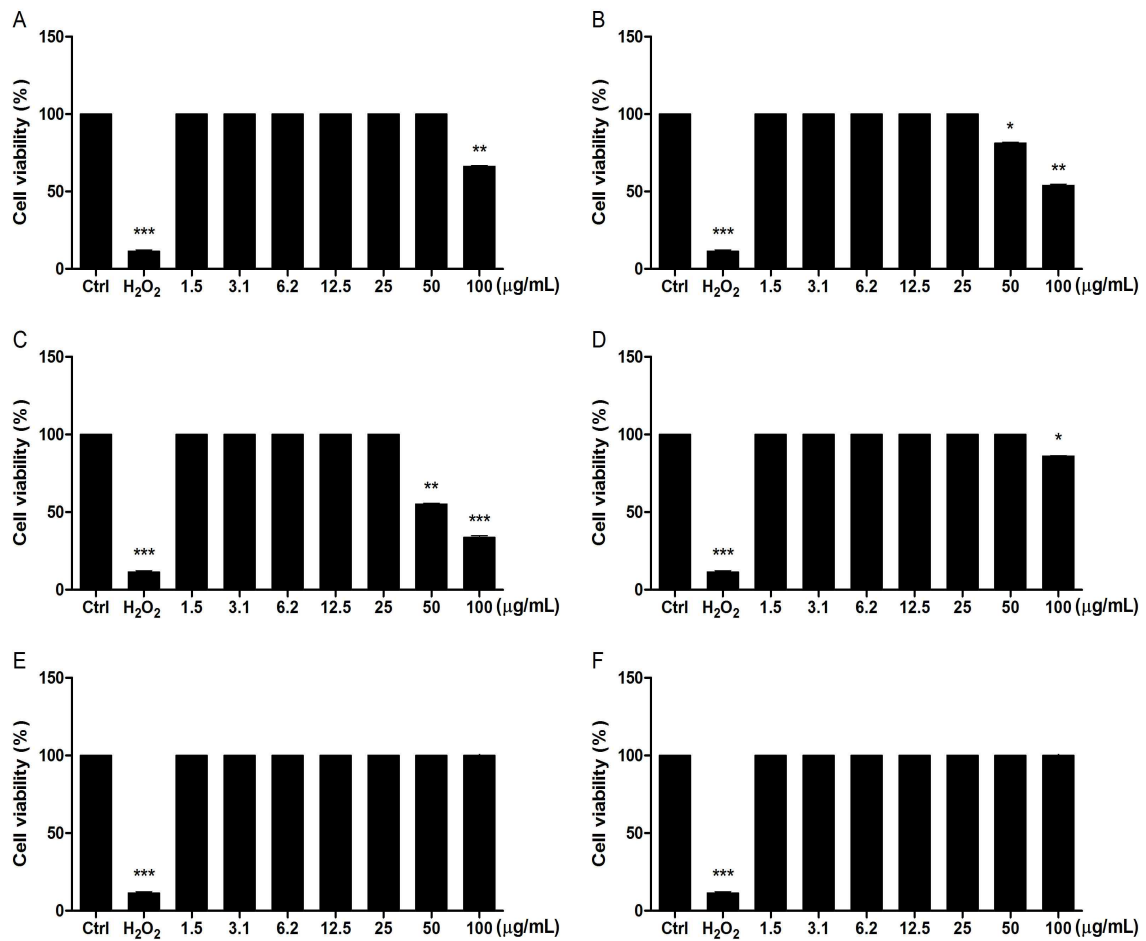


Fig 24. Effect of white rose petal extracts on cell viabilities.
 (A. EtOH, B. BuOH, C. EA, D. HEX, E. CHCl₃, F. H₂O)

(7) NO scavenging assay

(가) *in-vitro* 세포에서 항산화효과를 확인하기 위해 Raw264.7 세포에 각 추출물 및 분획물을 처리한 후 lipopolysaccharide(LPS) 의한 nitric oxide(NO) 생성 저해 정도를 확인한 결과 모든 시험물질에서 유의한 수준의 저해를 확인하였으며, 특히 EA 및 Hexane 분획물 25 µg/mL 처리군에서는 NO 생성억제물질인 L-NMMA와 유사한 수준의 NO 저해능이 나타났음 (Fig. 25).

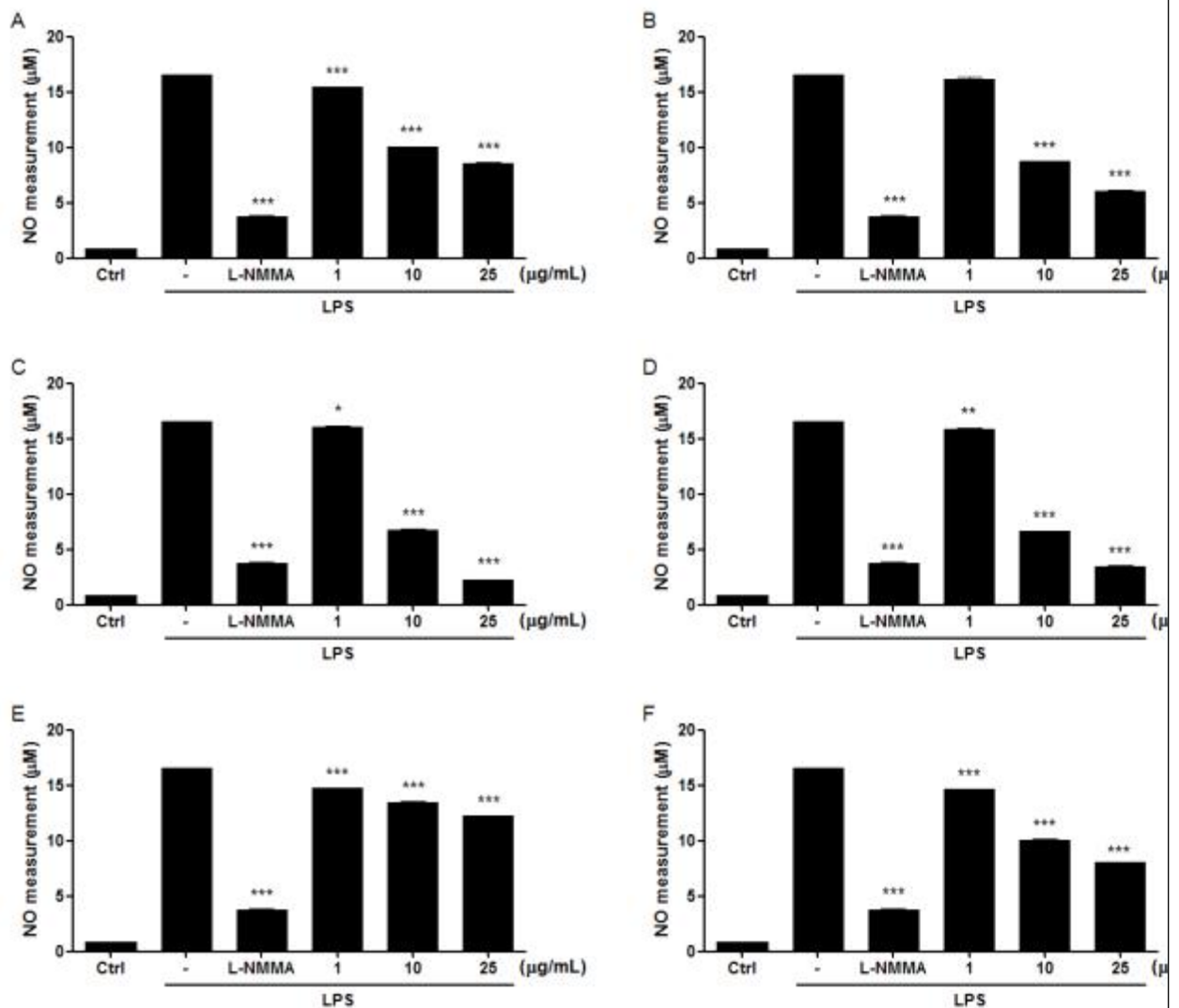


Fig 25. Nitric oxide scavenging activity of white rose petal extracts.
 (A. EtOH, B. BuOH, C. EA, D. HEX, E. CHCl₃, F. H₂O).

(8) 항산화 효능에 대한 유전자 활성 수준 검색

(가) 본 실험에서는 1차 선별된 BuOH 및 EA 분획물의 항산화효능검색을 위해 대식세포주인 Raw264.7세포에 각 분획물을 처리하여 NO를 생성하는 iNOS 및 세포내 항산화효소인 SOD의 유전자 발현패턴을 분석하였음. 아래 결과에서 나타난바와 같이 iNOS의 발현이 각 분획물의 고농도에서 효과적으로 억제됨을 확인하였으며, 항산화효소인 SOD중 세포질 non-inducible SOD인 CuZnSOD와 inducible SOD인 MnSOD의 발현은 EA 분획물에서 반응하는 것으로 분석되었음. 이와 같은 결과로부터 BuOH 및 EA 분획물의 선정이 유효함을 확인하였으며 EtOH에서 보다 높은 생리활성을 나타내는 것으로 보아 보다 유효한 active compounds가 존재할 것으로 예측됨 (Fig. 26).

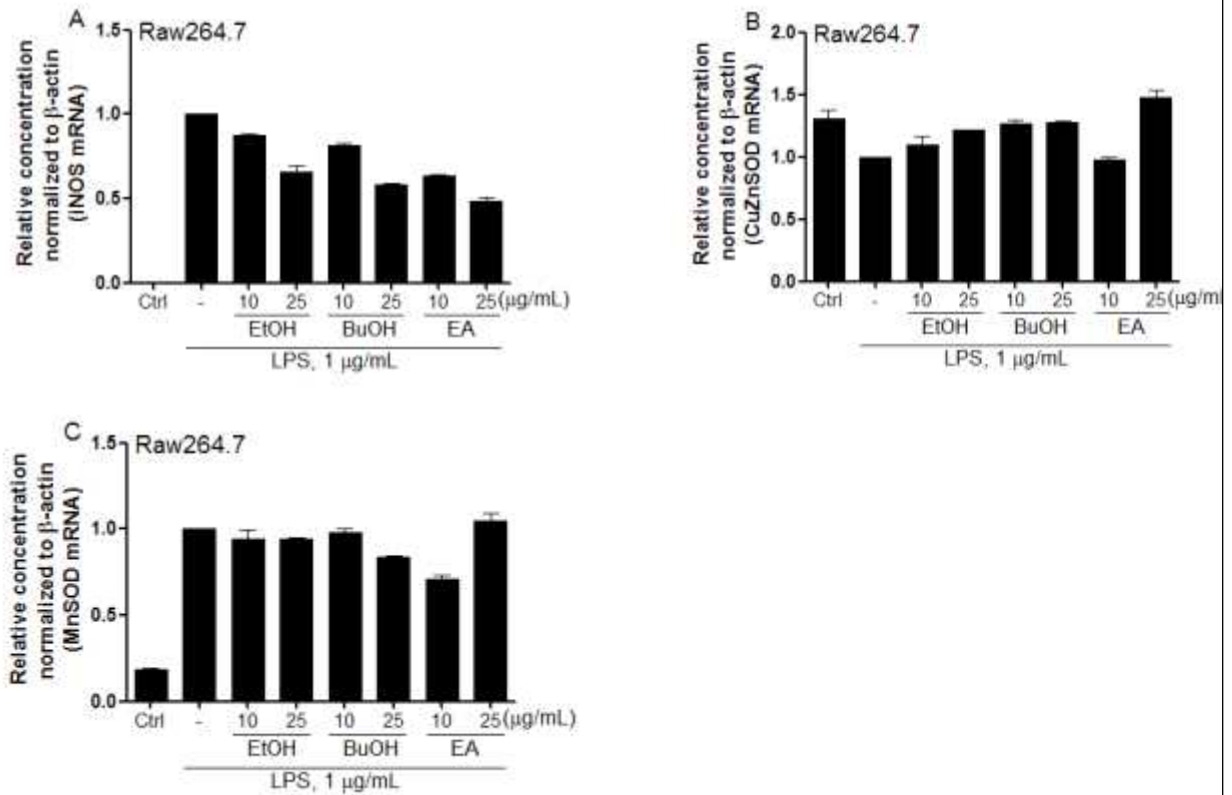


Fig 26. Effects of white rose petal extracts on the mRNA expression in RAW 264.7 macrophages (A. iNOS, B. CuZnSOD, C. MnSOD).

(9) 1차 추출물 및 분획물의 효능검색결과

(가) 1차 에탄올 추출물로부터 분획된 5종의 분획물의 각 효능검색결과 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물에서 상대적으로 우수한 항산화 및 tyrosinase 저해활성이 관찰되어 이 두 종의 부획물이 지표물질 분석에 적합한 대상으로 사료되었고, 특히 총 페놀성화합물의 경우 에틸아세테이트 분획물에서 월등히 높은 함량이 관찰되어 보다 유효한 분석대상이 될 것으로 생각됨.

Table 9. Quantitative compare ethanol extracts and fractions from white rose petal extracts.(Ascorbic acid or positive control for standard, 100 %)

항목	EtOH	BuOH	EA	HEX	CHCl ₃	water
DPPH radical scevenging activity	23.5	37.0	54.4	0.0	0.0	24.2
Protein degradaion activity	86.6	72.7	94.5	66.9	24.8	91.7
Tyrosinase inhibition activity	19.8	20.9	39.5	38.4	3.5	9.3
MMP-1 inhibition activity	68.8	69.9	68.6	58.4	2.7	80.5
NO scavenging activity	38.4	44.1	56.6	58.0	28.5	38.1
총점	237.1	244.6	313.6	221.7	59.5	243.8
평균	47.42	48.92	62.72	44.34	11.90	48.76

(10) 1차 분획물의 성분분석결과

(가) 백장미 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)분석

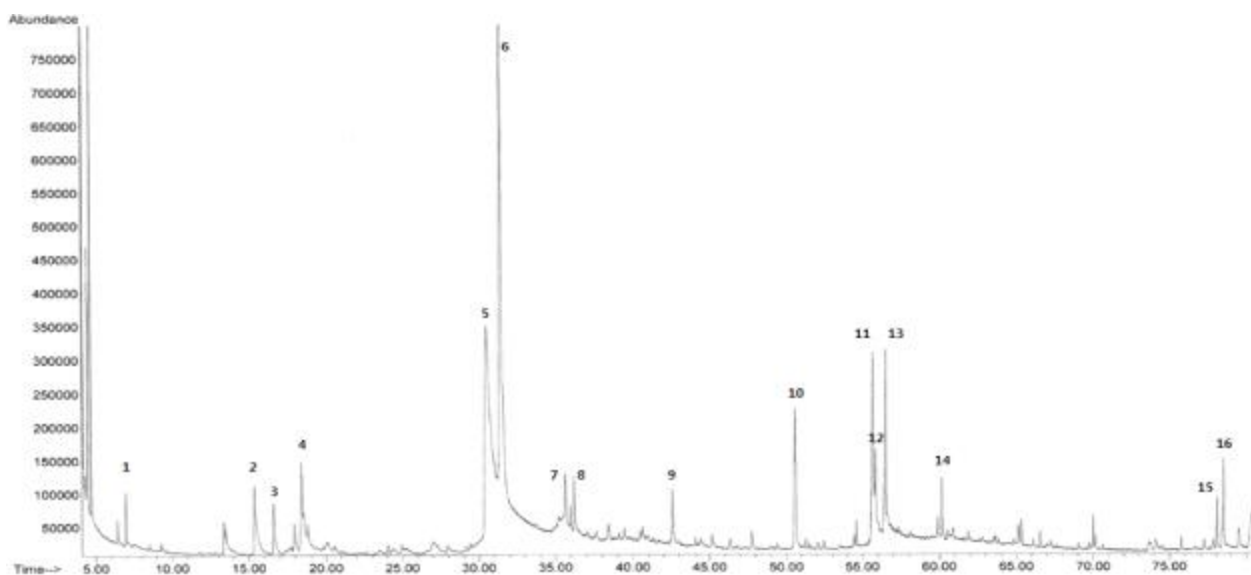
- ① 백장미 꽃잎 에탄올 추출물 각 분획물의 구성성분과 함량 정도를 알아보기 위하여 에틸아세테이트, 부탄올, 클로로포름 및 물 분획물을 대상으로 CTC CombiPAL autosampler system (Palo Alto, CA, USA)이 장착되어있는 GC-MS (Agilent Technologies 5975C)를 사용하여 분석. 시료 분석에 사용된 컬럼은 HP-5 column (Agilent Technologies, 250 μm \times 0.25 μm \times 30 m)으로 1 μl 의 시료를 분석. injector temperature는 250 $^{\circ}\text{C}$ 이며 GC oven은 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 정지 후 분당 3 $^{\circ}\text{C}$ 간격으로 280 $^{\circ}\text{C}$ 까지 측정하였음. 용매 피크를 고려하여 5분후부터 데이터를 수집하여 분석하였으며 성분 분석을 위해 Wiley7N library data를 사용하였음.
- ② GC-MS 분석결과 아래와 같은 생물학적 활성물질이 각 분획물에 존재함을 확인하였음(GC-MS peak 및 library 분석 table). 특히 에틸아세테이트 분획물에서 indole, pyrogallol 등 항산화, 항염증 및 미백 등 항장관련 소재로 활용가능한 성분이 포함되어있는 것으로 확인되었고, 부탄올 분획물에서도 indole, pyrogallol, butanoic acid 등을 포함하여 에틸아세테이트 분획물과 대등한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 생각되었다. 따라서 1차 추출물 및 분획물의 생물학적 효능검색에서 나타난 에틸아세테이트와 부탄올 분획물의 효능이 몇몇의 활성성분에 의한 것으로 판단되며 이들 두 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 보다 적합한 지표물질 분석 대상으로 판단됨.

Table 10. Comparing major bioactive compounds of the secondary fractions.(Area, %)

	Ethyl acetate	Butanol	Chloroform	Hexane	H ₂ O
Indoles	○(39.9 %)	○(36.3 %)	○(8.8 %)		
Pyrogallol	○(23.8 %)	○(15.1 %)			
Hexadecanoic acid	○(3.9 %)				

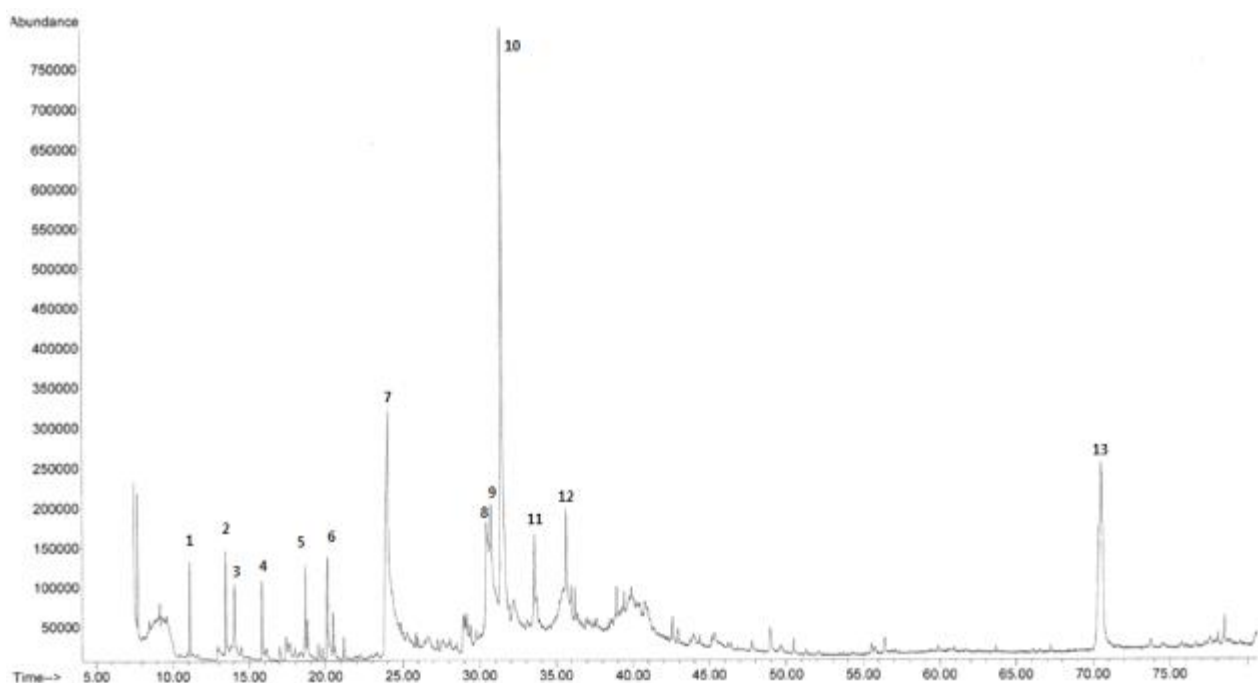
Octadecanoic acid	○ (5.8 %)		○ (18.9 %)	○ (14.1 %)	
Butanoic acid		○ (1.7 %)			○ (13.5 %)
γ-Sitosterol		○ (14.2 %)		○ (15.1 %)	○ (33.7 %)
Linoleic acid				○ (0.8 %)	

⊕ Ethyl acetate



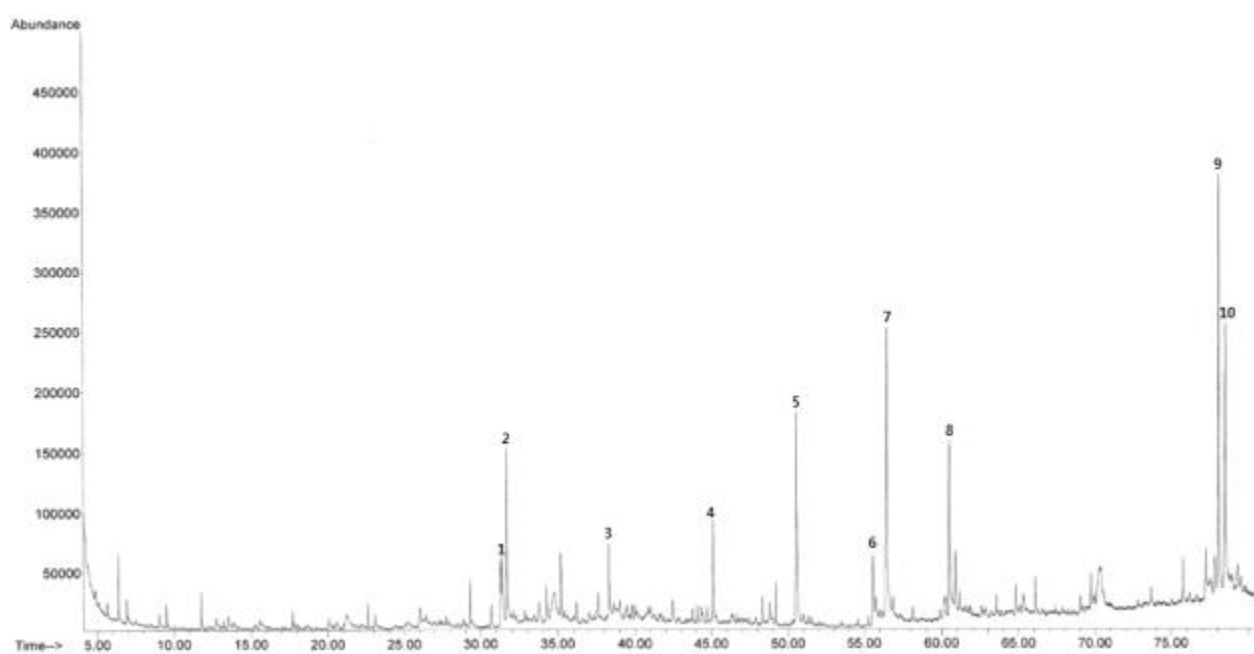
Peak	RT (min)	Library	Area %	Qual %
1	6.964	Cyclotrisiloxane	0.53	90
2	15.364	2-Octanone	3.05	47
3	16.606	Ethene,-1-(4-nitrophenyl)-2-nitro-Carbamic acid, butyl ethyl ester	1.42	60
4	18.428	Ethanol, 2-nitro-, propionate	3.05	32
5	30.509	Pyrogallol	23.75	95
6	31.442	4-(N-Methylamino)-6,7-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramet hylbenzo)indole	39.85	83
7	35.646	Dibenzo [a,c] cyclooctene, 5,6,7,8-tetrahydro-	2.65	27
8	36.218	Pyrrolo [3,4-c] carbazole-1,3(2H,3aH)-dione	1.58	38
9	42.571	4-Methoxyacenaphthylene	1.45	46
10	50.598	Hexadecanoic acid	3.85	99
11	55.702	Octadecadienoic acid	5.91	99
12	55.857	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	3.01	94
13	56.532	Octadecanoic acid	5.78	99
14	60.169	Octadecane	1.12	98
15	78.095	17-Hydroxy-3-methoxy-13-methyl-16- (phenylthio)-7,8,9,11,12,13,14,15, 16,17-decahydro-6H-cyclopenta [a] phenanthrene	0.99	72
16	78.533	1-(p-tolyl)-3-(6-quinoly)benzo [f] quinoline	2.01	64

⊕ Buthanol



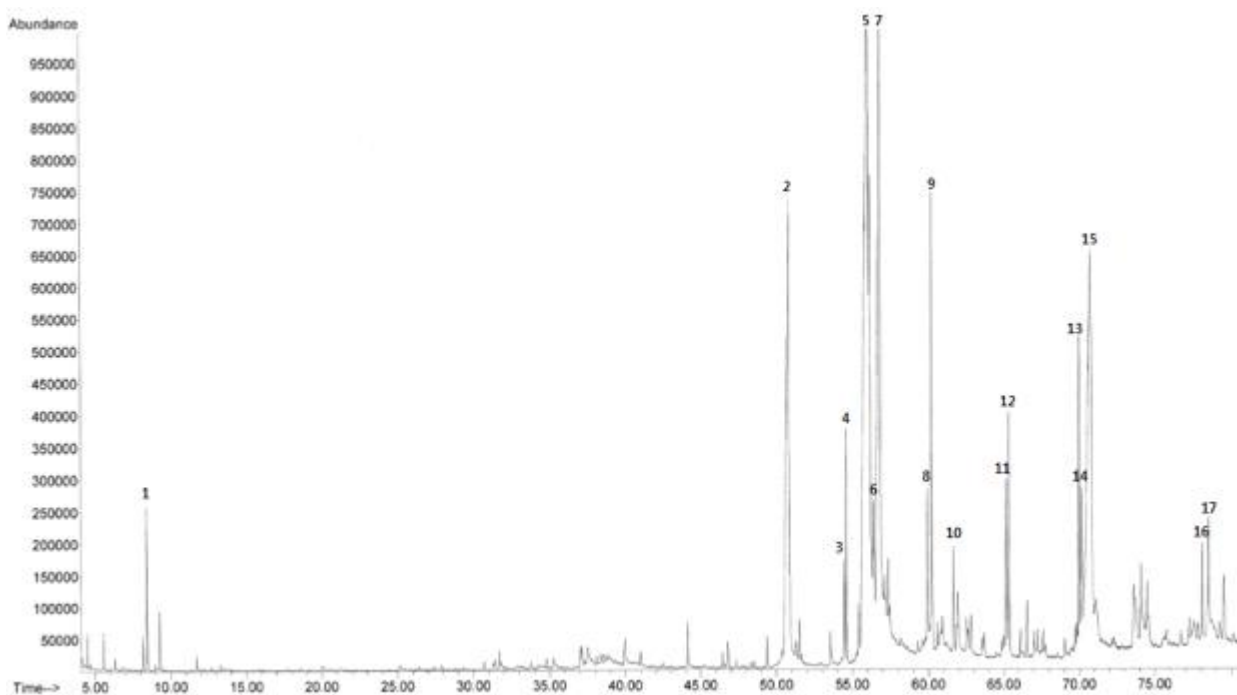
Peak	RT(min)	Library	Area %	Qual %
1	11.103	3,4-diaminobenzonitrile	1.05	80
2	13.452	Silanol, trimethyl-, formate	2.10	35
3	14.038	Butanoic acid	1.70	49
4	15.840	2-Propanone, diethylhydrazone	1.19	38
5	18.692	3-Imino-3H,5H- [1,2,4] thiadiazolo [3,4-a] isoindole	1.00	59
6	20.121	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	2.50	91
7	24.066	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)	16.99	94
8	30.451	Pyrogallol	6.45	94
9	30.735	Pyrogallol	8.73	91
10	31.430	4-(N-Methylamino)-6,7-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethylbenzo)indole	36.26	86
11	33.567	2-(2-phenylcyclopropanyl)thiophene	3.25	59
12	35.652	2-(3'-Hydroxypropyl)-3,5,6-trimethyl-1,4-benzoquinone	4.53	72
13	70.545	Gamma.-Sitosterol	14.24	99

⊕ Chloroform



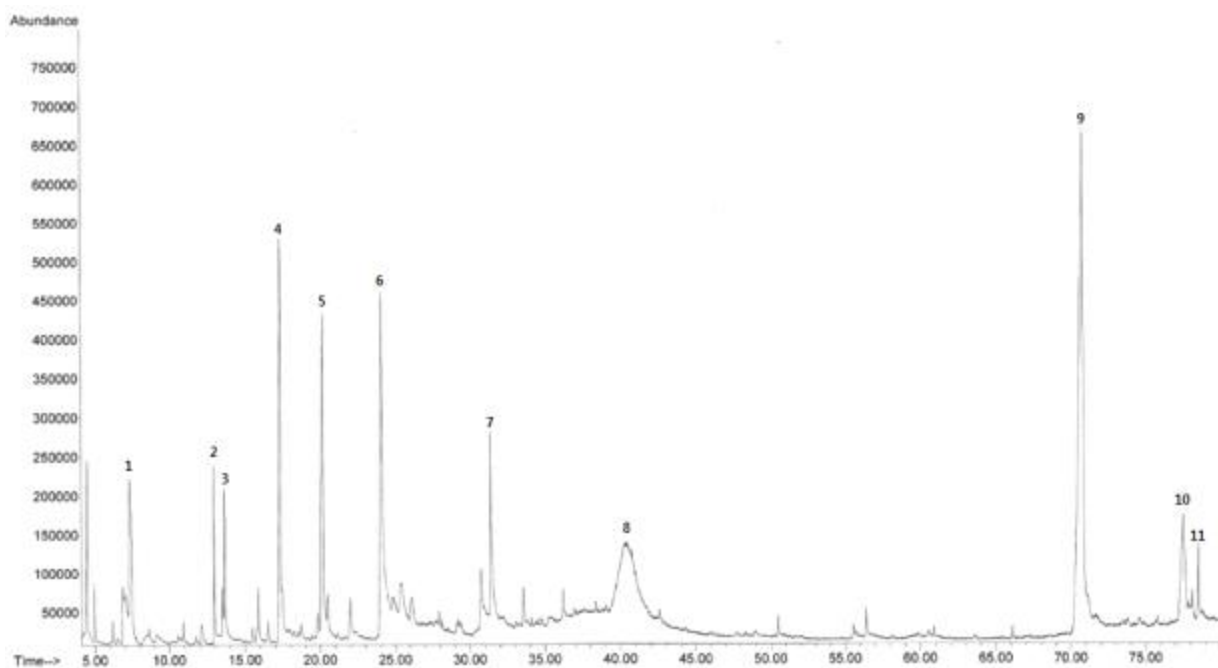
Peak	RT(min)	Library	Area %	Qual %
1	31.262	Benzenamine, 2,5-difluoro-	2.82	38
2	31.687	1H-Indole	8.82	53
3	38.317	(3S*,5R*,6R*,7E,9.xi.)-3,6-Epoxy-7-megastigmen-5,9-diol	3.71	78
4	45.108	Vomifoliol	5.78	64
5	50.559	Hexadecanoic acid	13.21	99
6	55.574	9,12-Octadecadienoic acid	1.39	98
7	56.488	Octadecanoic acid	18.86	99
8	60.510	tert-Butylketene	9.15	25
9	78.115	Preussomerin I	21.02	72
10	78.539	2,8-diisopropyl-peri-xanthenoxanthene-4,10-quinone	15.25	83

⊕ Hexane



Peak	RT(min)	Library	Area%	Qual%
1	8.445	p-Xylene	1.08	97
2	50.843	Hexadecanoic acid	12.86	99
3	54.460	Octadecadienoic acid	0.83	99
4	54.615	Heneicosane	1.94	99
5	56.069	Octadecadienoic acid	32.85	99
6	56.423	Linoleic acid ethyl ester	1.42	99
7	56.848	Octadecanoic acid	14.07	99
8	59.938	9-Tricosene	2.40	99
9	60.221	Eicosane	4.64	95
10	61.656	Linoleic acid	1.15	93
11	65.151	2-Methyl-z-2-docosane	2.22	93
12	65.351	Pentacosane	2.48	98
13	70.005	17-Pentatriacontene	3.11	90
14	70.140	Heptacosane	1.26	99
15	70.758	Gamma.-Sitosterol	15.07	99
16	78.108	3.Alpha.,5-Cyclo-Ergosta-7,22-Dien-6-One	0.97	83
17	78.540	25-Epiaplysterylacetate-1	1.66	76

⊕ H₂O



Peak	RT(min)	Library	Area%	Qual %
1	7.369	Cyclotrisiloxane	6.17	72
2	12.969	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	1.85	64
3	13.677	Cyclotetrasiloxane, octamethyl	2.40	90
4	17.378	Cyclotetrasiloxane, hexamethyl	9.91	72
5	20.204	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	8.26	91
6	24.085	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-	12.45	64
7	31.391	3,7-Di-tert-butyl-1-naphthol	4.08	83
8	40.422	Butanoic acid, silver(1+) salt	13.48	43
9	70.745	Gamma.-Sitosterol	33.67	99
10	77.522	Pregn-20-en-3-ol, 20-methyl-,(3.beta.,5.alpha.)-	6.02	52
11	78.533	25-Epiaplysterylacetate-2	1.72	62

다. 2차 분획물의 확보, 효능검색 및 성분분석결과

(1) 실험방법

(가) 1차 분석결과에 따라 에틸아세테이트 분획물을 지표물질 분석 대상으로 선정하였으며 2차 분획 확보를 위해 silica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merck)으로 충전하여 1차로 20가지의 컬럼 분획물을 확보하였다. 이 분획물에 대해 Thin-ayer chromatography (TLC)를 수행한 후 총 4가지의 fraction(F)을 분류하여 이를 F1, 2, 3, 4로 명명 한 후 실험을 진행하였음

(2) Thin-layer chromatography (TLC)

(가) 에틸아세테이트 분획물에 대한 TLC는 Chloroform:Methanol=80:20의 용매조건과 15% H₂SO₄ 용액을 이용한 염색방법을 사용하여 아래와 같은 밴드를 확인하였음. TLC결과 도출된 밴드의 패턴을 기준으로 F1(0~2번), F2(3번), F3(4번~10번, 11번은 10번과 11번의 겹침 현상이 심해 제외함) 및 F4(12번~20번, 밴드패턴이 유사하여 함께 합침).

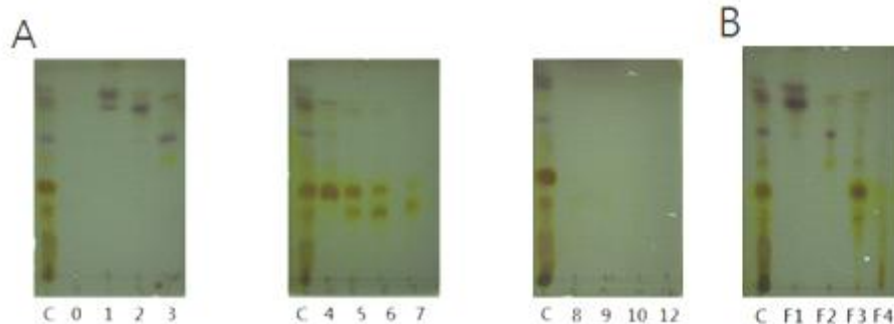


Fig 27. Analysis by TLC of Ethyl acetate secondary fractions.

(A, Analysis by TLC of each column fractions; B, Analysis by TLC after separating by pattern.)

(3) Ethyl acetate 2차 분획물에 대한 biological activity screening

(가) DPPH radical 소거능

① Ethyl acetate 분획물에서 분리한 4 종류의 2차 분획물을 대상으로 DPPH radical 소거능을 확인한 결과 fraction2와 fraction4에서 상대적으로 가장 강한 scavenging 효능을 확인할 수 있었으며, 특히 fraction4의 경우 1.5 μg 처리군에서도 높은 효과가 확인되어 다른 2차 분획물에 비해 높은 항산화 활성을 갖는 물질이 함유되어 있을 것으로 사료됨 (Fig. 28).

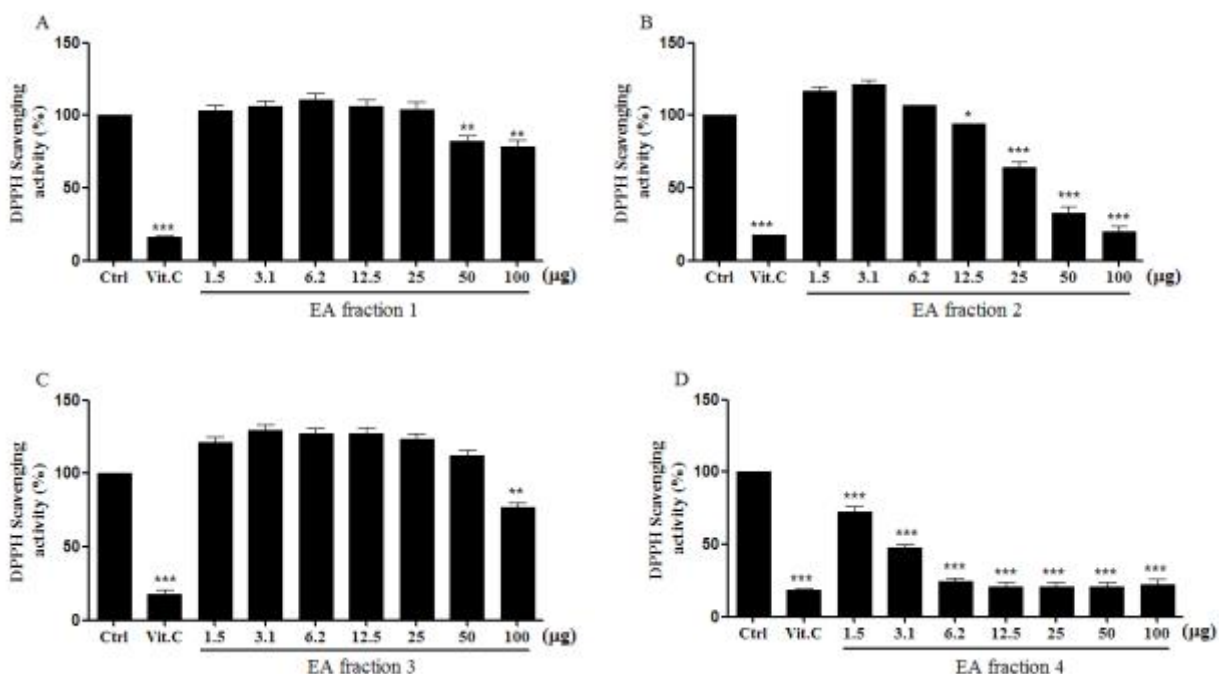


Fig 28. DPPH-scavenging activities of ethyl acetate secondary fractions from white rose petal extracts. (A. fraction 1, B. fraction 2, C. fraction 3, D. fraction 4)

(나) 금속이온 촉매 산화억제효과

- ① 각 2차 분획물에 대한 금속이온 촉매 산화억제효과를 확인한 결과 fraction1을 제외한 모든 2차 분획물에서 최저농도의 시험물질까지 유의한 효과가 나타나 상대적으로 뛰어난 단백질 분해 보호능을 가지는 물질이 함유되어 있는 것으로 판단됨 (Fig. 29)

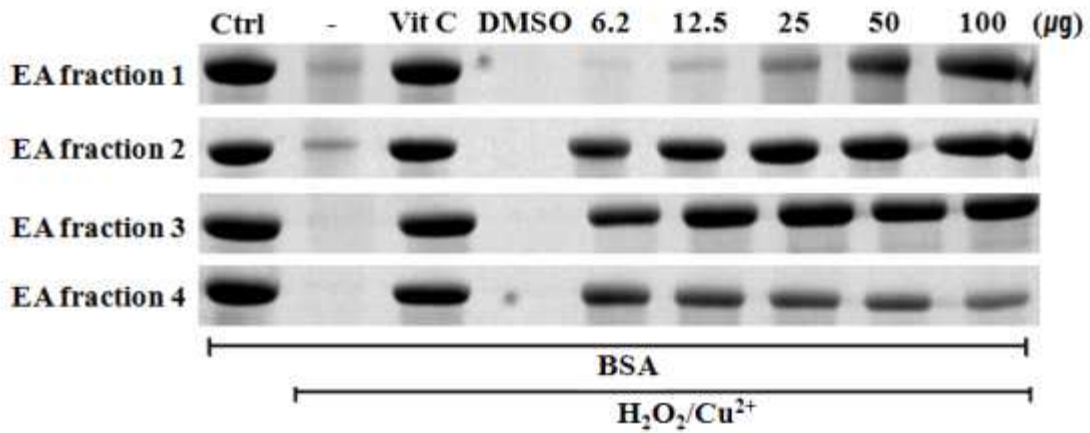
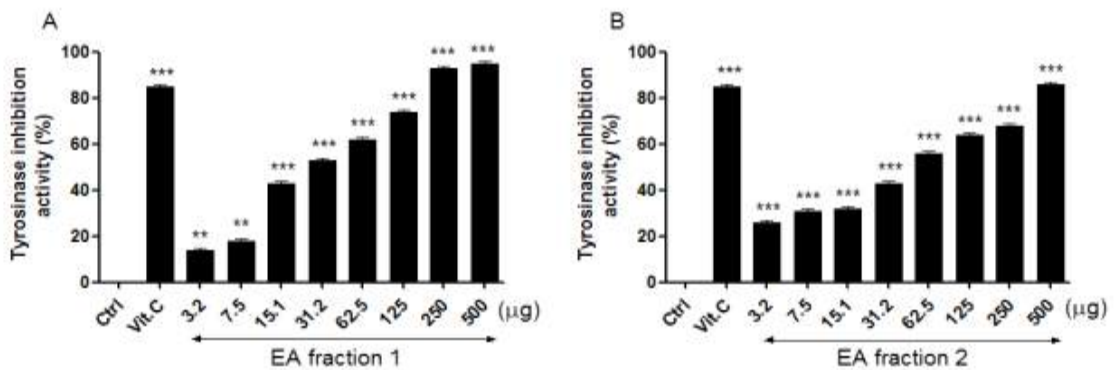


Fig 29. Protective effects of Ethyl acetate secondary fractions against radical-induced protein degradation.

(다) Tyrosinase 저해 효과

- ① 4종의 2차 분획물을 대상으로 tyrosinase 효과를 확인한 결과 모든 분획물에서 최저 농도 처리군까지 유의한 저해 효과를 관찰할 수 있었으며, 상대적으로 fraction2와 4에서 높은 효과가 나타났음 (Fig. 30)



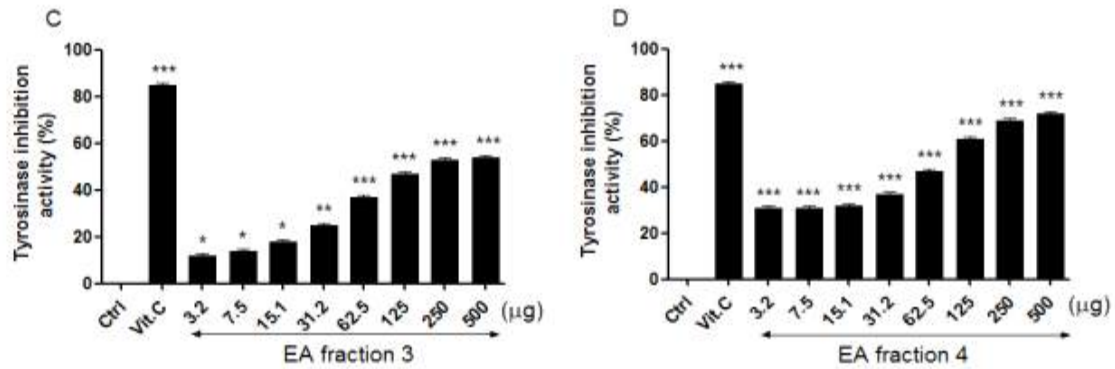


Fig 30. Tyrosinase inhibition activity of ethyl acetate secondary fractions from white rose petal extracts.

(A. fraction 1, B. 39fraction 2, C. fraction 3, D. fraction 4).

(4) 2차 F1-F4 분획물의 성분분석결과

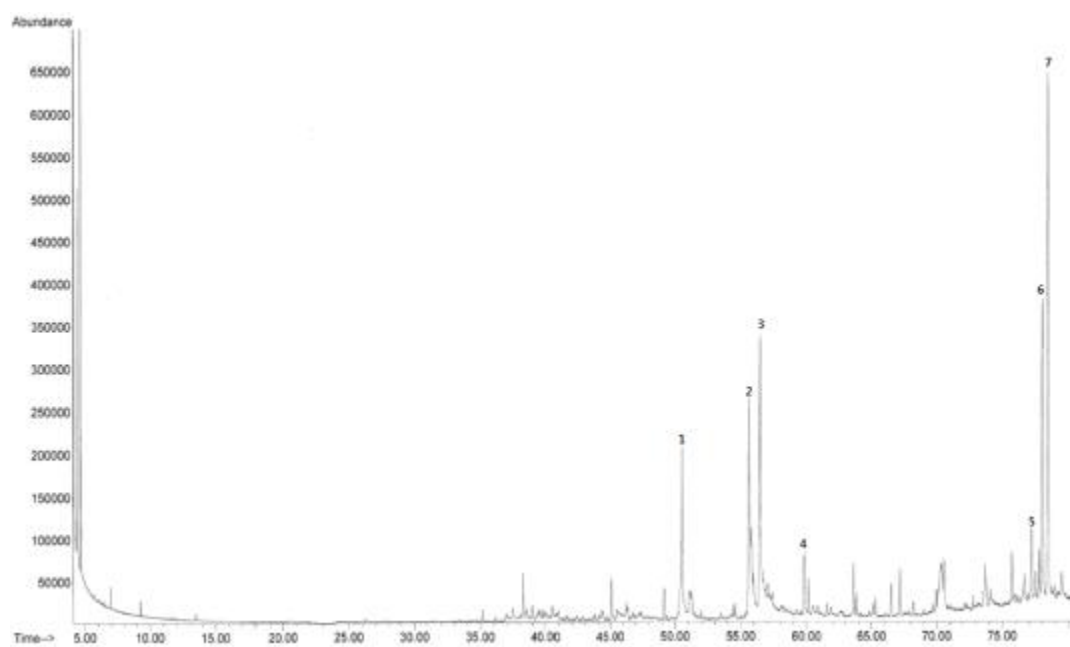
(가) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)분석

- ① F1-F4 분획물의 구성성분을 확인하기 위해 CTC CombiPAL autosampler system (Palo Alto, CA, USA)이 장착되어있는 GC-MS (Agilent Technologies 5975C)를 사용하여 분석하였음.
- ② 시료 분석에 사용된 컬럼은 HP-5 column (Agilent Technologies, 250 μm \times 0.25 μm \times 30 m)으로 1 μl 의 시료를 분석하였음. injector temperature는 250 $^{\circ}\text{C}$ 이며 GC oven은 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 정지 후 분당 3 $^{\circ}\text{C}$ 간격으로 280 $^{\circ}\text{C}$ 까지 측정하였음. 용매 피크를 고려하여 5분후부터 데이터를 수집하여 분석하였으며 성분분석을 위해 Wiley7N library data를 사용하였음.
- ③ TLC패턴별 컬럼분획물(F1-F4)의 GC-MS 분석결과 (GC-MS peak 및 library 분석 table)아래와 같은 생물학적 활성물질이 에틸아세테이트 분획물로부터 유래되었음을 확인하였음.
- ④ 에탄올 추출물로부터 분획된 5종의 분획물 중 가장 효능이 우수한 것으로 나타난 에틸아세테이트 분획물의 2차 컬럼 분획물(F1-F4)의 GC-MS 분석결과 향장관련 생물활성 소재의 판단이 가능하였으며, 특히 F1-F4 중 효능이 가장 우수하게 나타난 F4의 경우 indole의 상대함량이 73 %로서 F4의 항산화, 미백 및 향장관련 효능의 주된 지표물질이자 유효물질로 판단되며 에틸아세테이트 분획물에서도 39 %의 높은 상대함량이 관찰되어 상호 일치된 유효성분으로 생각됨.

Table 11. Comparing major bioactive compounds of the secondary fractions. (Area %)

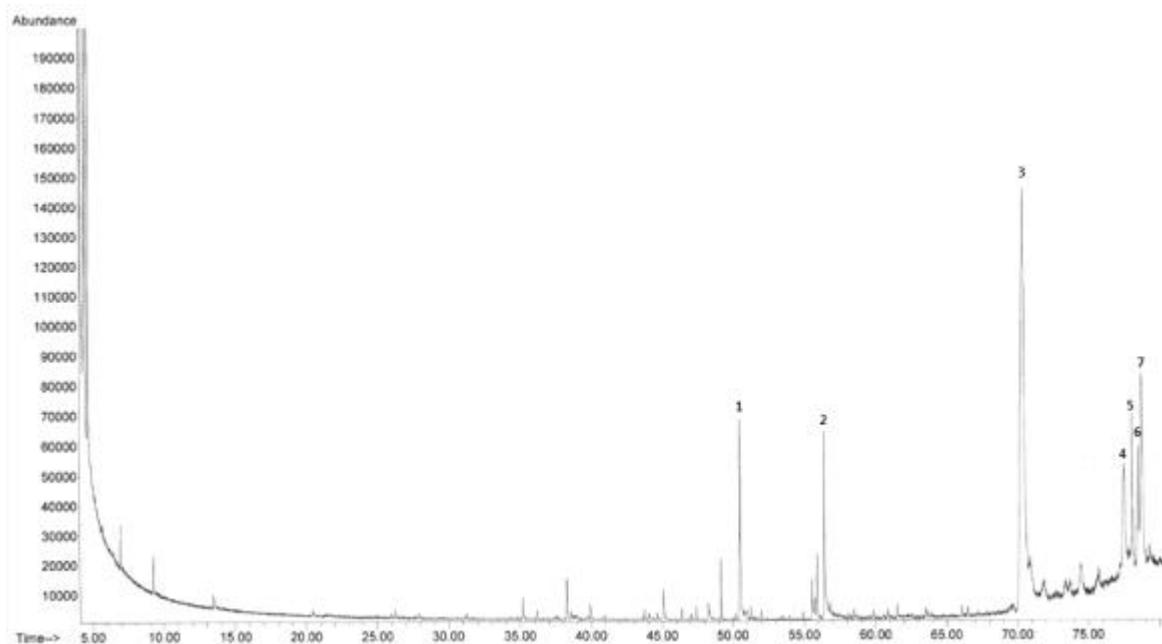
	Ethyl acetate	F1	F2	F3	F4
Indoles	○ (39.9 %)				○ (73.0 %)
Hexadecanoic acid	○ (3.9 %)	○ (12.2 %)	○ (6.9 %)		
Octadecadienoic acid	○ (5.9 %)	○ (20.3 %)			
Octadecanoic acid	○ (5.8 %)	○ (19.4 %)	○ (6.5 %)	○ (3.0 %)	○ (3.2 %)
γ-Sitosterol			○ (54.8 %)		

⊕ F1



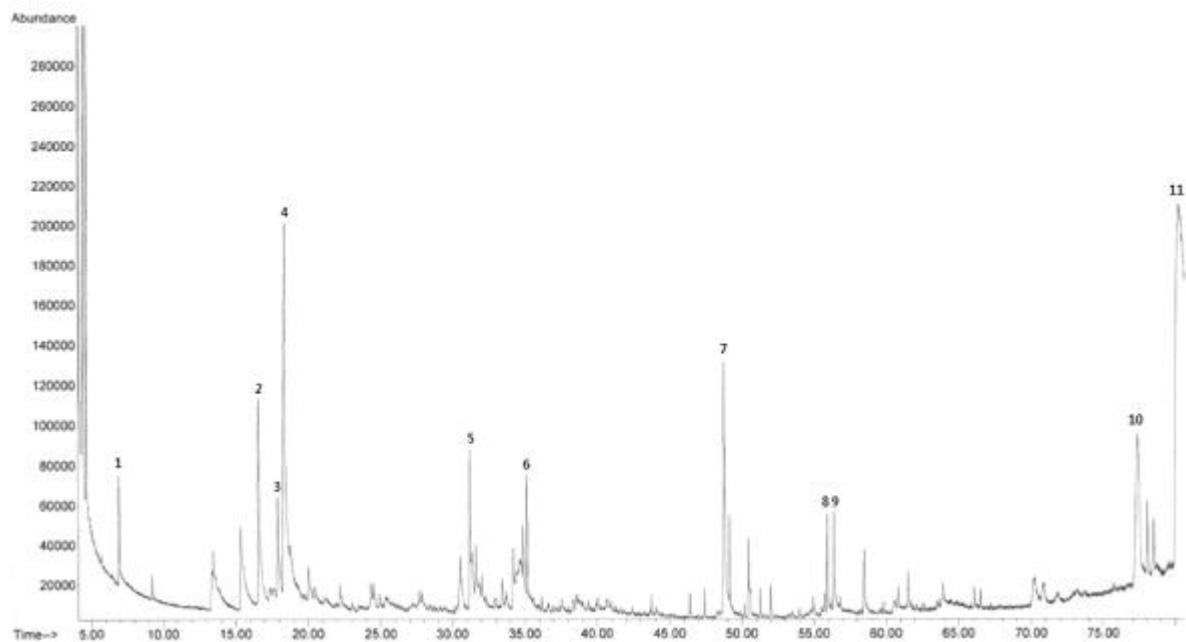
Peak	RT(min)	Library	Area%	Qual %
1	50.559	Hexadecanoic acid	12.18	99
2	55.663	Octadecadienoic acid	20.31	98
3	56.500	Octadecanoic acid	19.41	99
4	59.828	4-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-1-(4-nitrophenyl)- 3-phenyl-2-pyrazolin-5-one 2a,2b,6b,6c-tetrahydro-6c-methyl-1,2,2a-triphenylbe	3.07	78
5	77.220	nzo [a] cyclopropa [c,d] pentalene	3.61	64
6	78.076	Preussomerin I	13.98	78
7	78.520	2,8-diisopropyl-peri-xanthenoxanthene-4,10-quinone	27.44	83

⊕ F2



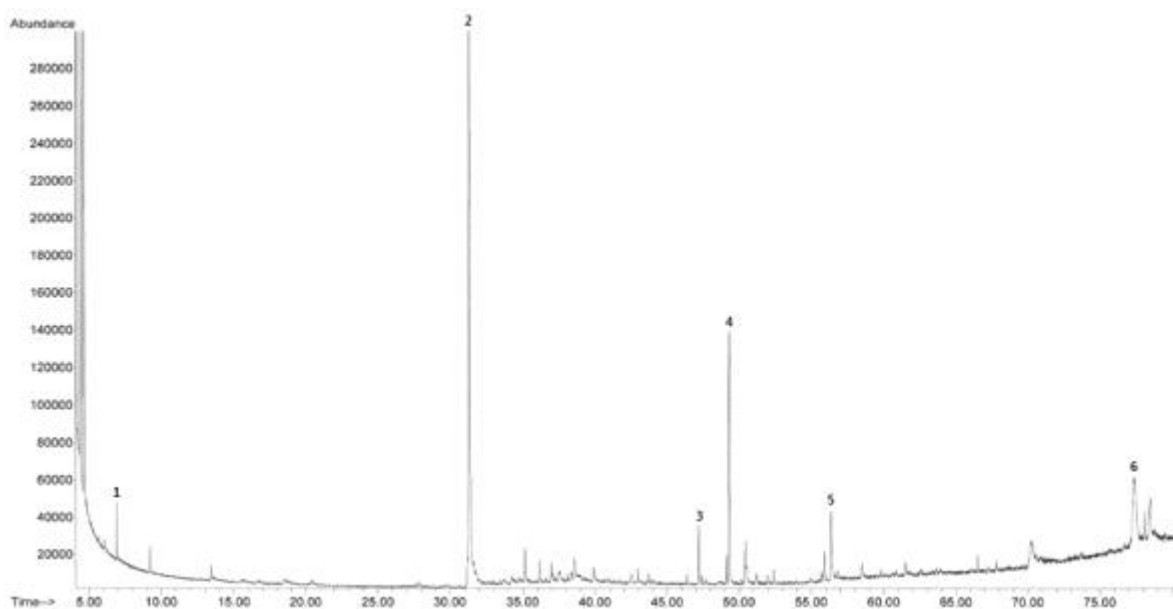
Peak	RT(min)	Library	Area %	Qual %
1	50.501	Hexadecanoic acid	6.86	96
2	56.404	Octadecanoic acid	6.46	99
3	70.365	Gamma.-Sitosterol	54.75	99
4	77.510	Sitostenone	7.50	95
5	78.070	17-Hydroxy-3-methoxy-13-methyl-16-(phenylthio)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthrene	5.06	52
6	78.507	Stigmastan-3,5-dien	5.45	91
7	78.732	4-[.beta.-[p'-(Di-n-butylamino)-p-stilbenyl]vinyl]pyridine	13.92	90

Ⓢ F3



Peak	RT(min)	Library	Area %	Qual %
1	6.926	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	1.68	83
2	16.561	2-Imidazolidinethione	10.06	38
3	17.887	Methyl ribofuranoside	5.11	35
4	18.370	L-Serine	22.47	47
5	31.205	2,3-Difluoroaniline	5.70	38
6	35.150	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	2.54	96
7	48.770	(3S*,5R*,6R*,7E,9.xi.)-3,6-Epoxy-7-megastigmene-5,9-diol	9.29	59
8	55.915	2-Methoxy-7-methylquinoxaline	3.04	53
9	56.385	Octadecanoic acid	3.03	99
10	77.407	Butanoic acid, heptafluoro-, 4-[2-[(2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-oxobutyl)amino]ethyl]phenyl ester	13.66	33
11	80.226	Kaempferol	23.42	99

Ⓣ F4



Peak	RT(min)	Library	Area %	Qual %
1	6.919	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	1.21	78
2	31.320	4-(N-Methylamino)-6,7-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethylbenzo)indole	73.04	86
3	47.219	1-(1H-indol-2-yl)-1,3,3-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydrocyclopent[b]indole	1.99	90
4	49.330	3-Cyano-5,6-dihydro-4-(methylthio)-2-phenylbenzo[h]quinoline	9.39	90
5	56.372	Octadecanoic acid	3.23	99
6	77.381	2-Propyn-1-one, 1-(2-thienyl)-, 4-dinitrophenyl)hydrazone Vouacapenic acid	11.15	38

라. 지표물질 분리를 위한 분획물의 선별

(1) 각 분획물에 포함되어 있는 잠정적인 지표물질을 스크리닝하기 위해 GC-MS 분석을 수행한 결과 총 7종의 후보물질이 선정되었으며, 이 중 정량적 평가에서 가장 높은 점수를 보인 ethyl acetate와 BuOH 분획물에 높은 비율로 함유되어 있는 4-(N-Methylamino)-6,7-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethylbenzo)indole이 최종 지표물질로서 제기되었음.

마. 지표물질의 분리

(1) 산·염기 추출법 적용 후 역추출에 의한 분리 (단일 지표물질 분리 공정)

(가) 지표물질로 판단되는 indole을 가장 많은 비율로 함유하고 있는 ethyl acetate 분획물로부터 순수한 지표물질을 분리하기 위해 별도의 단계적 분리공정으로 수행하였음.

(나) 최초 100 g의 백장미 꽃잎을 ethanol로 추출하여 1차 분획 후 ethyl acetate 분획물 380 mL을 확보하였음. 확보된 ethyl acetate 분획물에 60 mL 용량의 0.2 N HCl을 2회 첨가하여 분리한 HCl층에 0.2 N NaOH 130 mL을 첨가하였음. NaOH가 첨가된 HCl층(약 250 mL)으로부터 150 mL 용량의 ethyl acetate로 역추출하여 약 80 mg의 indole complex를 분리하였으며, 2차 역추출을 통해 약 118 mg을 확보하였음(Fig. 31). 따라서, ethyl acetate 분획물 내에는 약 198 mg의 indole complex 함유되어 있는 것으로 나타났으며, 이는 ethyl acetate 분획물의 용매를 증발농축기를 이용하여 제거하였을 때 확보되는 약 3043.8 mg의 약 6.5 %에 해당됨.

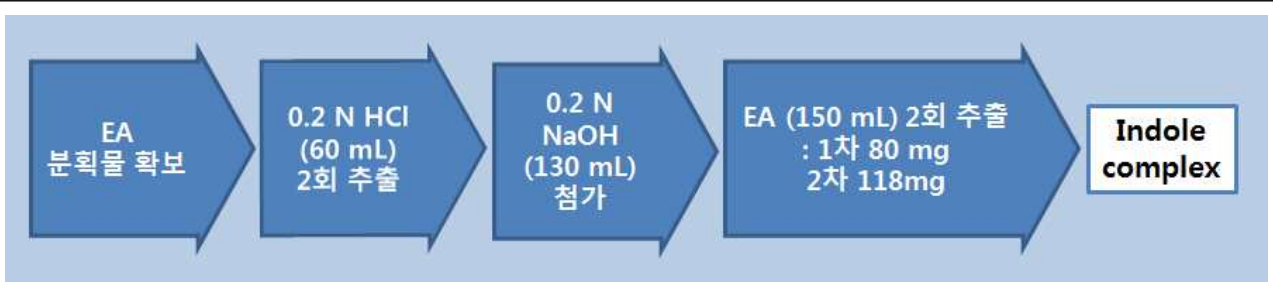


Fig 31. Acid-base extraction and ethyl acetate reverse extraction for indole complex.

- (다) 일련의 과정을 거쳐 분리된 indole complex로부터 상대적으로 순수한 indole을 분리해 내기 위해 역추출한 1차 시료를 대상으로 silica gel column chromatography를 수행하였다(Fig. 32).
- (라) Silicagel column chromatography를 위해 약 10 cm의 silicagel layer를 만든 후 hexane으로 충전하여 준비하였다. 추출하여 건조한 indole complex를 ethyl acetate에 녹여 loading한 후 충전제로 사용한 hexane을 150 mL 흘려보낸 뒤 ethyl acetate로 분획을 실시하였음(Fig. 32-B). 분리된 추출물은 총 3종류의 패턴으로 나타났으며, 3종의 시료를 농축하여 GC/MS 분석을 수행한 결과 3번 분획물에서 indole이 확인하였음(Fig. 33).

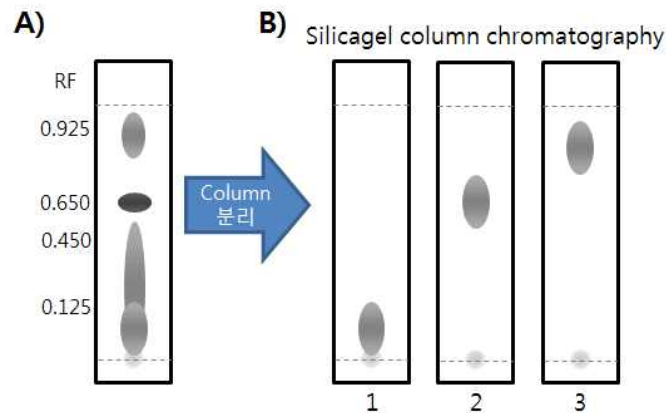


Fig 32. TLC pattern of the primary Ethyl acetate reverse extracts (A), TLC pattern after silicagel column chromatography (B).

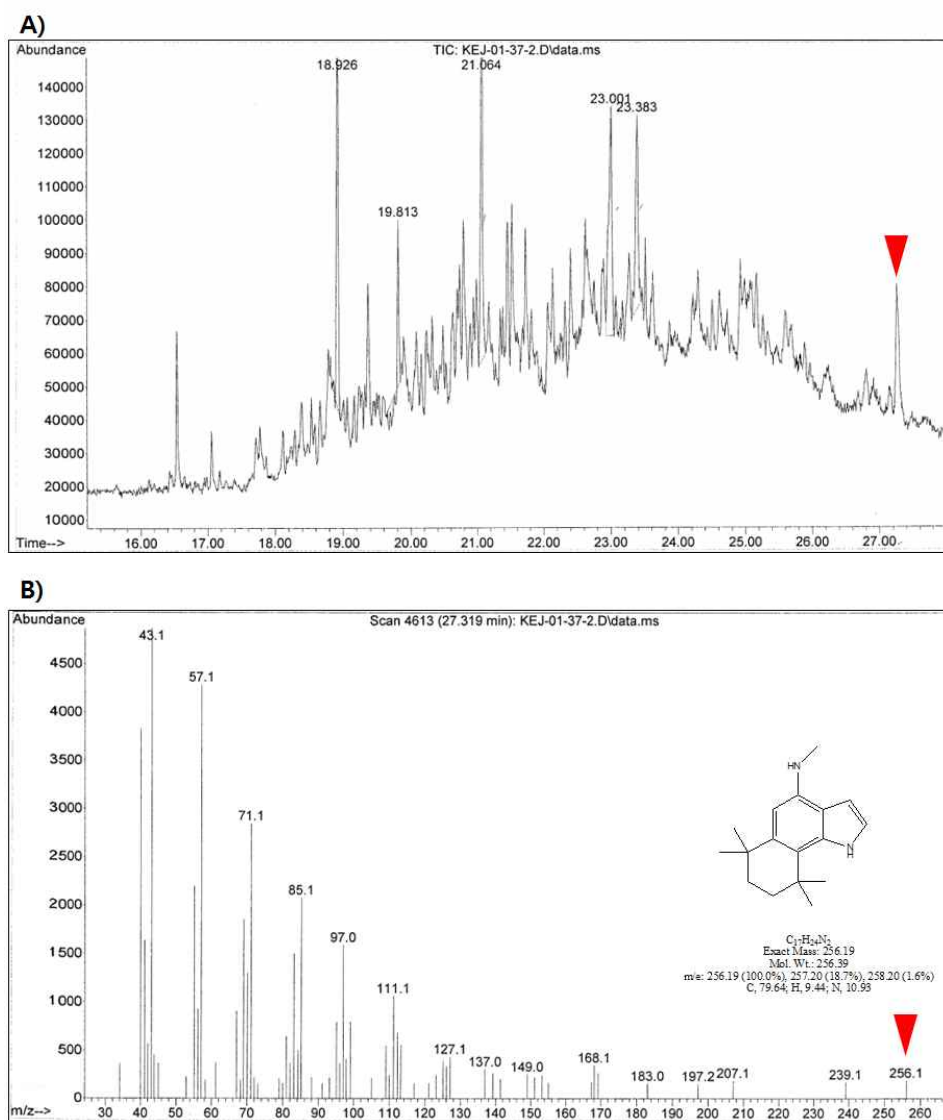


Fig 33. Analysis by GC-MS of third extracts through silica gel column chromatography (A) Separate level according to retention time, (B) Analyzed data about R.T. 27.319 min by GC-MS.

(마) 1차 추출물의 분획물에 대한 GC-MS 결과 retention time 27.317 min 시점에 예상되는 분자량인 256.1이 확인되었으나 mass값이 비교적 낮게 나타나 2차 추출물에 대한 분석을 별도로 수행하였음. Ethyl acetate 2차 역추출 시료 118 mg을 대상으로 1차 시료와 동일한 방법으로 silicagel column chromatography를 실시하였으며(Fig. 34), 분리된 추출물은 총 11개 패턴으로 구분되었고, 이 중 4, 5번에서 indole이 검출되었음(Fig. 35). GC-MS 분석 결과 1차 역추출물에 비해 단순한 패턴을 보임에 따라 상대적으로 순수한 indole이 분리된 것으로 나타났으며, mass값 역시 1차 역추출물에 비해 높은 흡광도 값을 보였음.

(바) 따라서, 에탄올 추출-ethyl acetate 분획-산·염기 추출-ethyl acetate 역추출의 분리 공정을 통해 indole complex를 성공적으로 분리할 수 있었으며, 상대적으로 순수한 indole을 분리하기 위해서는 2회 이상의 역추출을 수행해야 할 것으로 판단됨.

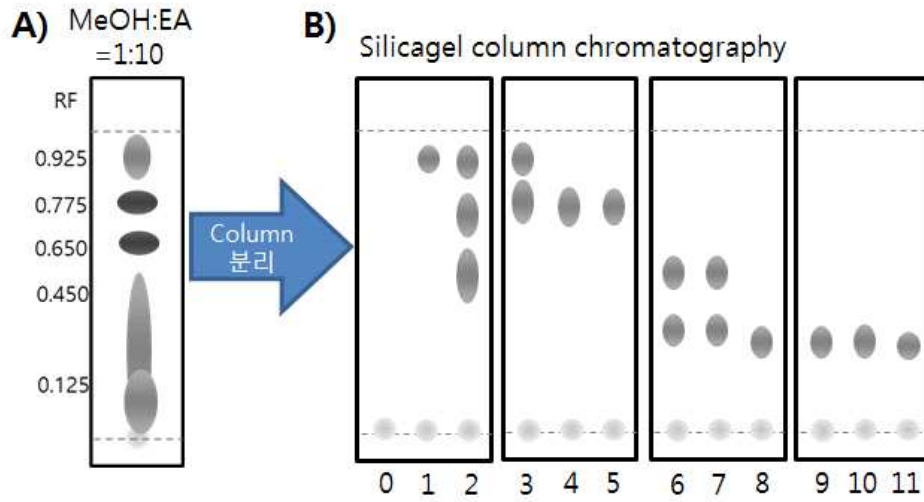
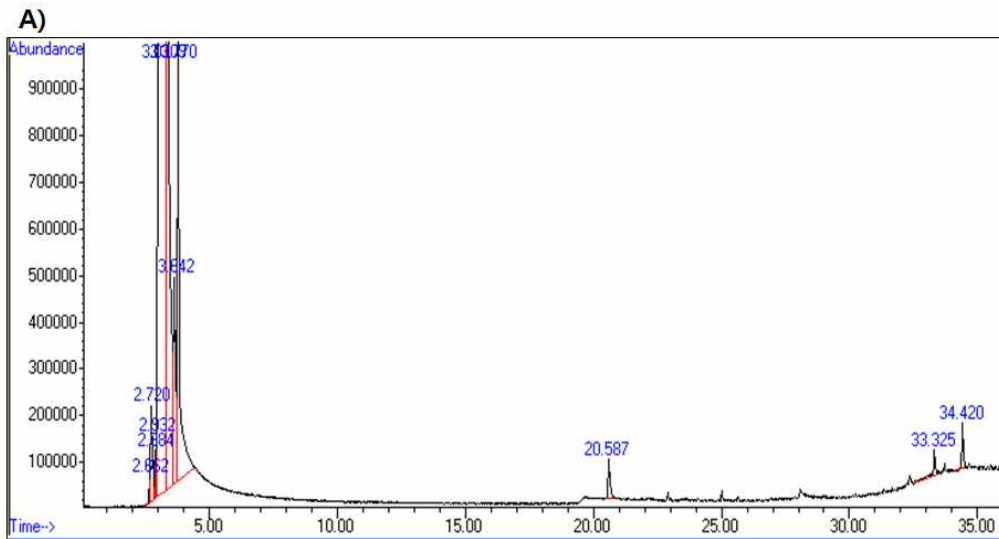


Fig 34. TLC pattern of the secondary Ethyl acetate reverse extracts (A) and separate pattern after silica gel column chromatography (0=hexane, 1~11 : ethyl acetate fractions).



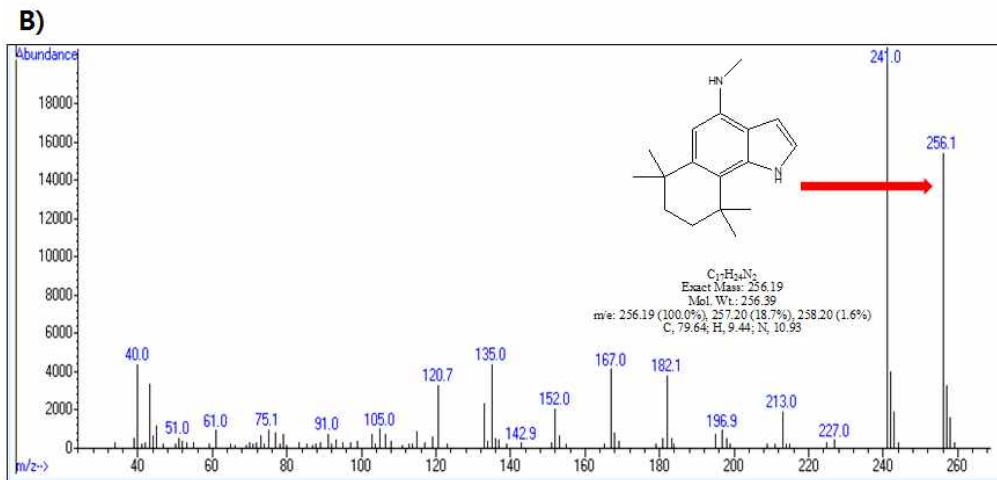


Fig 35. Analysis by GC-MS of fourth and fifth extracts through silica gel column chromatography (A) Separate level according to retention time, (B) Analyzed data about R.T. 20.587 min by GC-MS.

바. 지표물질 구조 동정

(1) Ethyl acetate 2차 역추출 시료의 column chromatography 분리 후 얻어진 샘플만을 대상으로 GC-MS의 library를 통해 검색된 indole의 예상되는 분자 구조를 구명함으로써(Fig. 36) 잠정적 지표물질의 구조를 검증하고자 하였음.

4-(N-methylamino)-6,7-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethylbenzo)indole

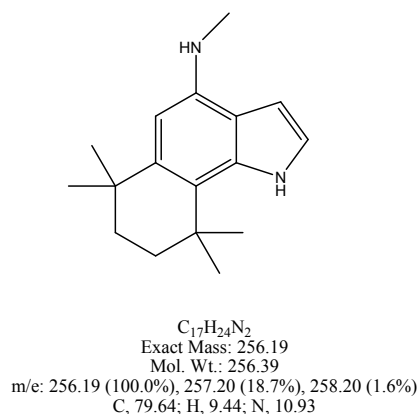


Fig 36. Molecular structure of the indole.

(2) Indole 구조의 검증

(가) NMR 분석

① 1H -NMR 기기 분석은 Varian 300 MHz spectrometer를 사용하였으며, 분석 용매는 deuterated chloroform ($CDCl_3$)를 사용하였고, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane

(TMS)를 기준점($\text{Si}(\text{CH}_3)_4, \delta = 0$)으로 하였음.

- ② 그러나 NMR 분석을 수행한 결과 확인되는 패턴은 GC-MS library를 통해 확인된 indole의 분자구조를 유추할 수 없었음(Fig. 37).
- ③ 한편, ethyl acetate 분획물에 대한 GC-MS 분석 결과 indole 다음으로 높은 비율을 보인 물질은 pyrogallol로 확인되었는데 pyrogallol의 경우 gallic acid에 열을 가함으로써 얻지는 것으로 알려져 있으며, Park *et al.*(2009)에 따르면 HPLC 분석을 통해 백장미 꽃 추출물 내에서 gallic acid의 존재를 확인한 바 있음. 분석을 통해 검출된 pyrogallol이 백장미 꽃잎 내에 높은 비율로 존재할 수도 있으나 Gas chromatography 분석의 경우 검출하고자 하는 시료를 기화시켜 분석함에 따라 pyrogallol은 백장미 꽃잎 내의 gallic acid로부터 유래했을 가능성이 제기되어 gallic acid 표준물질 (G7384, Sigma; MW 170.12)과 비교하였음.

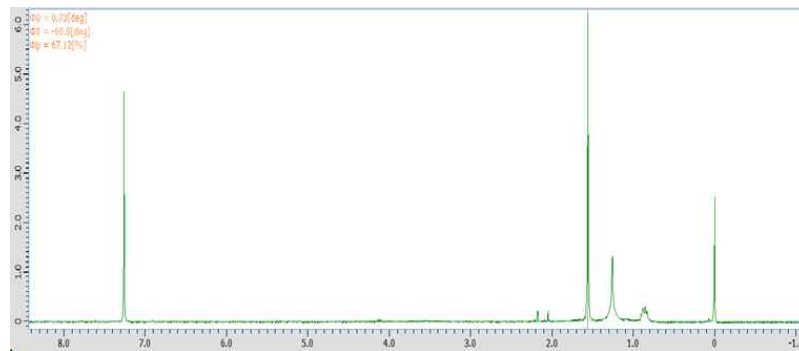


Fig 37. Analysis by NMR of separating sample using column chromatography after Ethyl acetate secondary reverse extraction.

(나) Gallic acid 표준물질 분석

- ① GC-MS 분석 조건은 에탄올 추출물 및 ethyl acetate 분획물의 분석 조건과 동일하게 수행하였음. Gallic acid 표준물질을 대상으로 GC-MS 분석을 수행한 결과 두 개의 뚜렷한 peak가 관찰되었는데 30.895 min 경에 pyrogallol이 확인되었고, 31.564 min에서 검출되는 peak의 경우 indole로 검색되었음(Fig. 38-A). 또한, indole로 검색된 peak의 mass값은 256으로 확인되었음(Fig. 38-B).

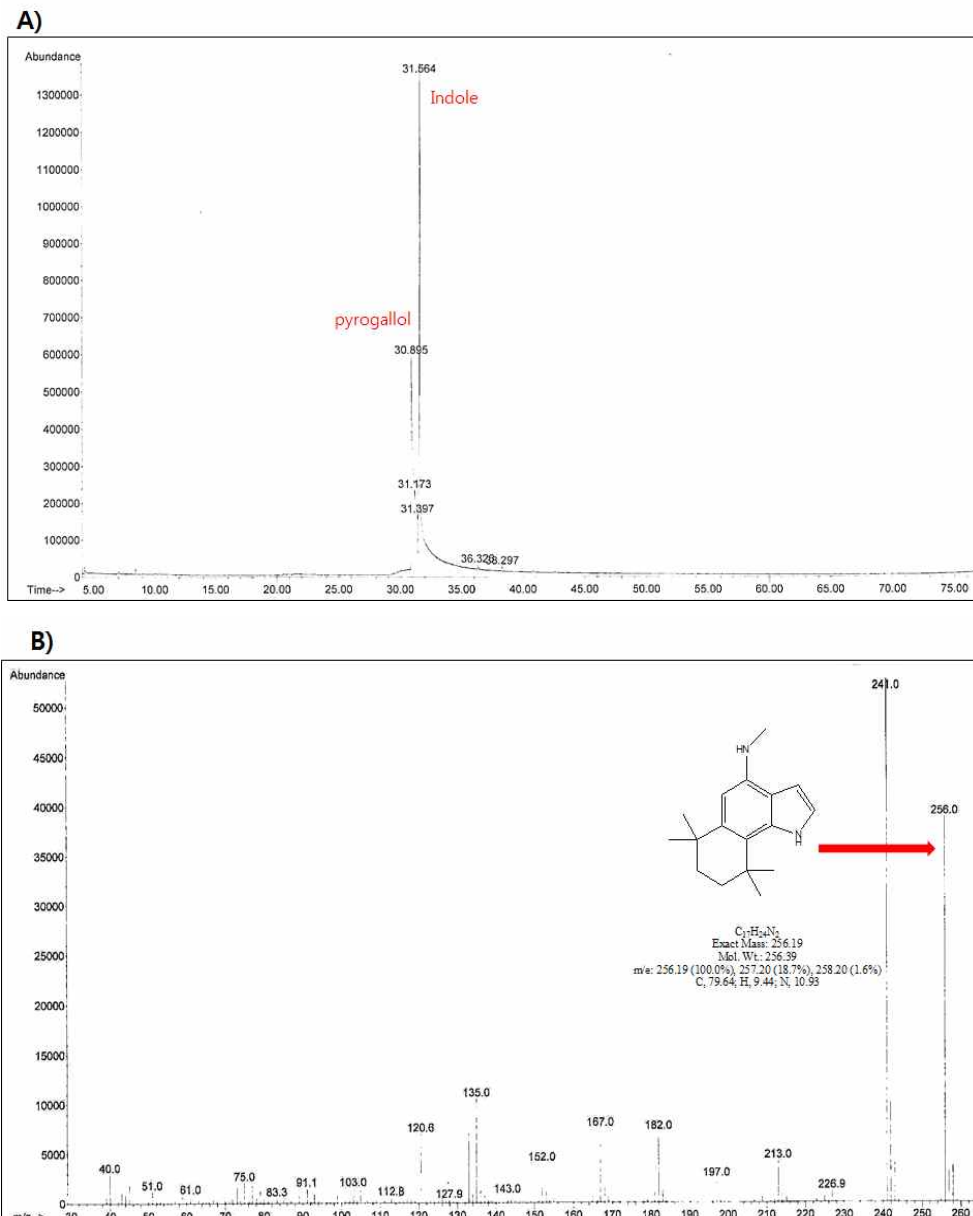


Fig 38. Analysis by GC-MS of Gallic acid standard. (A) Separate level according to retention time, (B) Analyzed data about R.T. 31.564 min by GC-MS.

- ② 이상의 결과를 기존 백장미 추출물 분석 결과와 비교해 보면 ethyl acetate 분획물, 산·염기 추출 후 역추출 시료에서 확인된 indole과 gallic acid 표준물질에서 검색된 indole이 모두 동일한 패턴의 mass값을 갖는 것으로 나타났을 뿐만 아니라 ethyl acetate 분획물과 gallic acid 표준물질의 경우 retention time의 분리 패턴까지 유사하였음(Fig. 39). 따라서 본 연구에서 GC-MS 분석을 통해 검색되었던 indole은 gallic acid로 확인되었으며, 이에 대한 NMR 분석을 통해 명확한 구조를 검증하고자 하였음.

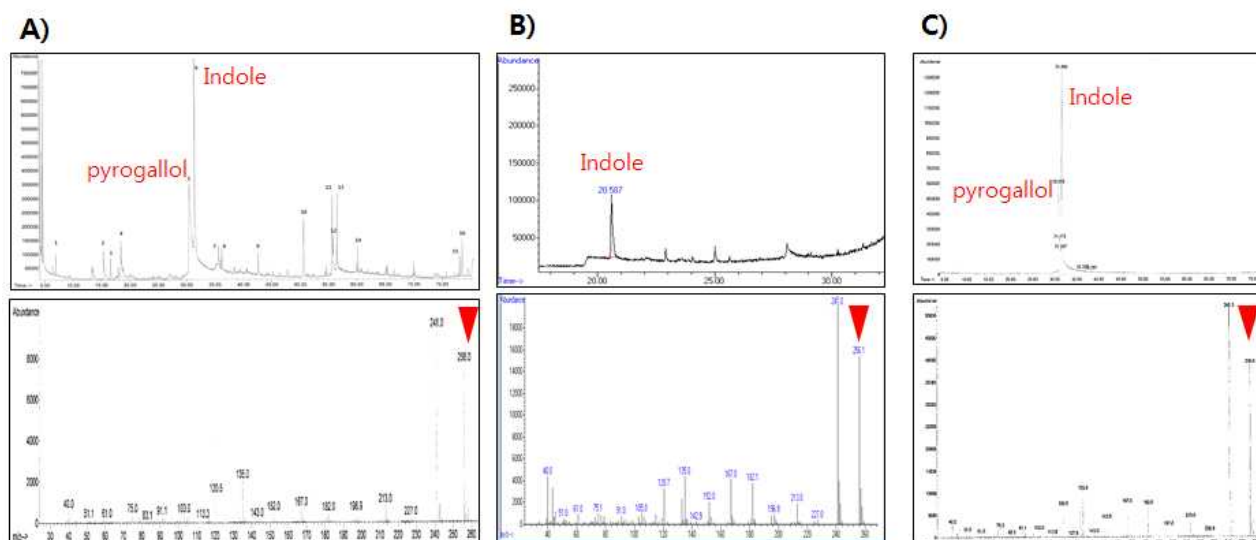


Fig 39. GC-MS analyzed Ethyl acetate fractions of white rose(A), Extracts of the white rose using reverse extraction after acid-base extraction.(B), gallic acid(C).

(3) 백장미 꽃잎 내의 gallic acid 구조 검증

(가) Recycling preparative(재순환 분취) HPLC분석

① 백장미 추출물 내에 포함되어 있는 indole이 gallic acid로 확인되었음에도 불구하고 ethyl acetate 2차 역추출 시료의 NMR 결과(Fig. 37)를 gallic acid로 판단하기에는 어려움이 있었음. 해당 시료가 천연물임을 감안할 때 산·염기 추출 후 ethyl acetate로 역추출을 실시하는 등 여러 단계의 정제과정을 거쳤음에도 불구하고 다른 2차 대사산물과 혼합되어 있을 가능성이 농후하여 보다 정밀한 분석을 위해 recycling preparative HPLC를 수행하였음.

② Ethyl acetate 2차 역추출 시료를 대상으로 recycling preparative HPLC (JAI-LC-9104, Japan Analytical Industry Co. Ltd)와 JAI UV 3702, JAI RI-7s 검출기를 사용하여 분획하였음. 분획시에는 gel permeation chromatography(GPC) column (JAIGEL-ODS-AP-L, SP-120-15, Japan Analytical Industry Co. Ltd)을 사용하였음. 100 % MeOH(UV cutoff 205 nm)을 이동상으로 하였으며, 5 mL/min의 유속으로 3개의 구간의 분획을 수확하였다. 시료는 약 73 mg을 MeOH 40 mL에 용해시켜 사용하였으며, 매 재순환 마다 주입되는 시료의 양은 20 mL로 설정하였음.

③ 재순환 결과 관찰되는 구간에 대해 가장 높은 peak부터 임의로 번호를 지정하였으며, 1, 3, 2번 peak의 순서로 분획물을 분리 및 수확하였으며(Fig. 40), 확보된 recycling preparative HPLC 분획물들을 대상으로 NMR 분석을 수행하였음.

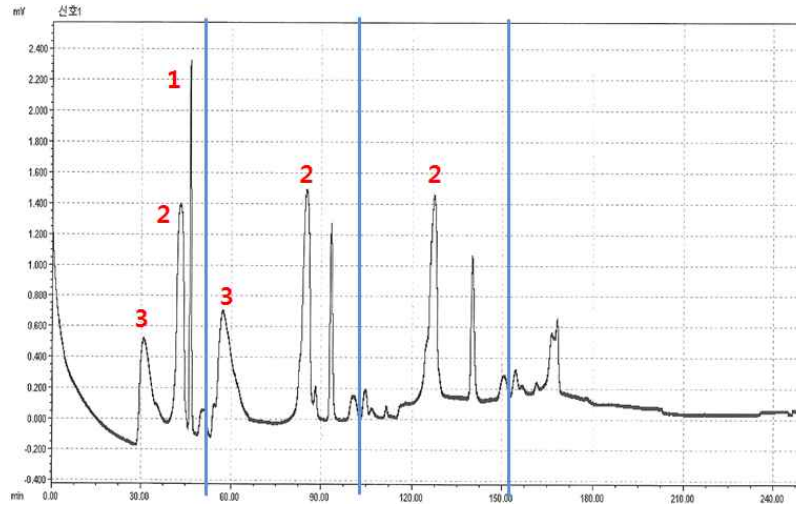


Fig 40. Analysis by recycling preparative HPLC of Ethyl acetate secondary reverse extracts.

(나) Recycling preparative HPLC 분획물에 대한 NMR 분석

- ① 3개 구간에서 확보된 3종의 재순환 분획물을 대상으로 NMR을 수행한 결과 1, 3번 구간에서는 뚜렷한 구조가 확인되지 않은 반면 2번 구간에서 분리된 물질의 경우 NMR분석 결과 δ 2.526 (1H, s, H-3, H-3', H-3''), δ 6.916 (1H, s, H-2, H-2'), δ 8~10 (1H, s, H1)으로 gallic acid인 것으로 동정되었음. 한편, -OH의 경우 본 결과보다 down field에서 확인되어야 함에도 불구하고 상대적으로 up field에서 확인되었는데 -OH의 경우 물질의 농도, 수소결합 등에 의한 δ 값이 차이가 날 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 ethyl acetate 역추출 후 얻어진 시료는 일부 다른 2차대 사산물을 포함하고 있기는 하지만 높은 순도의 gallic acid를 포함하고 있는 gallic acid complex임이 검증되었음.

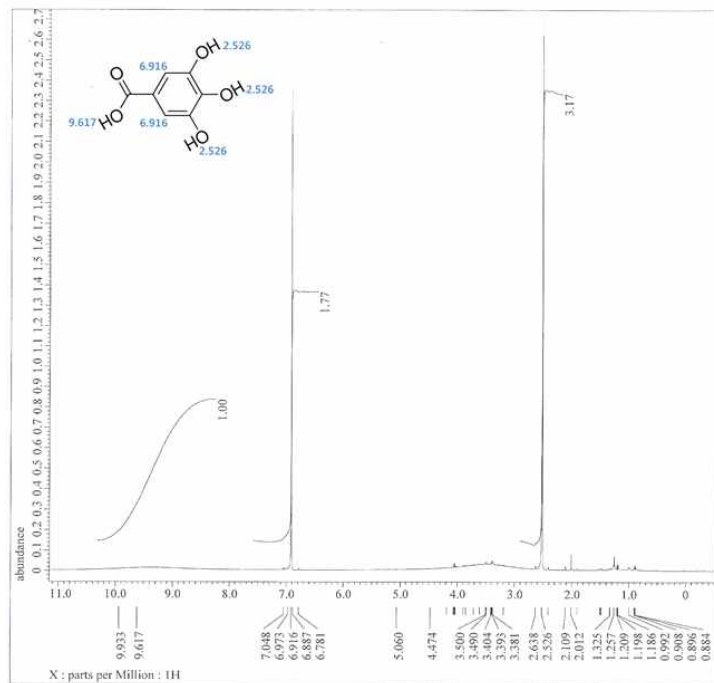


Fig 41. Analysis by NMR of secondary section after separate using Recycling preparative HPLC.

바. 지표물질 선정

(1) 지표물질의 확인

(가) 이상의 결과를 바탕으로 대표적인 지표물질은 gallic acid로 판명되었으며, 백장미 꽃 잎 추출물에 함유되어 있는 gallic acid의 함량을 확인하기 위해 지표성분 HPLC 분석법을 유효화 하고 HPLC-MS 분석을 통해 gallic acid의 존재를 재확인하였음.

(2) 지표성분 HPLC 분석법 유효화

(가) 분리 동정된 gallic acid를 지표성분으로 선정하고 정략적인 분석을 진행하기 위해 HPLC 분석 방법을 적용하여 분석법 유효화를 진행하였음. ICH(International Conference on Harmonisation) Topic Q2B Validation of Analysis 에서 권고하는 parameter인 정밀도, 정확도, 회수율, LOD, LOQ, 범위를 평가하였음

(나) 분석방법

① 분석장비는 Agilent HPLC 1260 모델로 이동상은 A : ACN/0.1 % Trifluoroacetic acid in H₂O(18:82), B : ACN/0.1 % Trifluoroacetic acid in H₂O(35:65), C : ACN/0.1 % Trifluoroacetic acid in H₂O(80:20)이고, 컬럼은 Eclipse XDB - C18 (4.6 × 250 mm), Agilent으로 온도는 25 ℃로 유지하고 예비 실험에서 가장 감도가 높았던 UV 파장 265nm에서 검출하였음.

이동상의 농도구배는 다음과 같음.

Time	A%	B%	C%
0	100	0	0
15	0	100	0
25	0	100	0
30	0	0	100
35	0	0	100
40	100	0	0

(다) Gallic acid 분석방법의 유효화 평가 parameter

① 직선성(linearity), 정밀도(Precision), 회수율(Recovery)

㉞ 적용범위의 농도에서 분석물질의 농도에 상응하는 측정결과를 얻을 수 있는가를 확인하는 것으로 직선의 상관계수로 R2 값이 0.99이상을 유효한 것으로 봄. 동일분석 조건에서 여러 번 측정된 값이 어느 정도 일치하는지에 대한 척도로 반복 측정값에 대한 표준편차와 RSD(%)로 정밀도를 표현함. 5% 이내 RSD(%)를 채택함. 회수율은 지표성분이 존재하지 않는 물질에 표준물질을 spiking하고 제시값에 대한 측정값을 회수율로 나타냄.

② LOD & LOQ, 정확도(Accuracy)

㉞ LOD와 LOQ는 ICH Q2B guideline의 계산식을 따랐으며 보통 signal-to-noise ratio에 의해 결정되며(LOD는 S/N이 3:1로, LOQ는 10:1), 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 산출하였음. 검출한계 식은 $LOD=3.3 \times \sigma/S$ 로 σ 는 반응의 표준편차를 의미하고, S는 검량선의 기울기를 의미하며 정량한계는 $LOQ=10 \times \sigma/S$ 의 계산식으로 산출하였음.

$LOD = 3.3 * (\sigma/S)$ $LOQ = 10 * (\sigma/S)$ $\sigma = \text{standard deviation of } y\text{-intercept}$ $S = \text{slope of the calibration curve}$

(라) 유효화 평가 parameter결과

① 직선성

㉞ 0.009~73 mg/kg의 농도 범위에서 14개의 농도로 표준물질의 제조하여 분석한 결과를 회귀분석한 결과 직선성은 직선의 상관계수가 0.9998로 높은 상관관계가 나타났음.

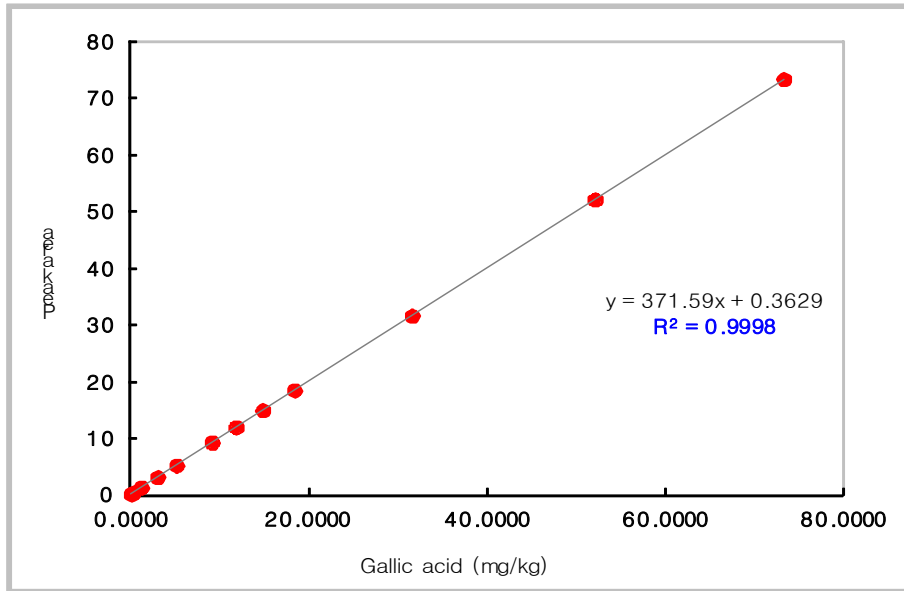


Fig 42. Gallic acid standard curve

② 정밀도

㉠ 직선성과 같은 농도 범위에서 각각 3회 반복 측정된 결과 각 농도에 대한 peak area의 표준편차와 RSD(%)는 아래 table 12와 같이 나타남..

Table 12. Peak area of standards according to the concentration.

농도	평균	RSD(%)	농도	평균	RSD(%)
0.0983	10.9949	11.9344	14.8832	1537.7641	1.9319
0.1999	22.6329	7.9511	18.4140	2253.9980	0.9676
0.4334	40.0036	7.6020	31.5868	4160.4513	0.3163
1.2652	103.6764	7.3110	52.1066	7510.8216	0.1578
3.0867	261.9085	5.1339	73.2767	10574.4667	0.3163
5.1894	610.4171	1.8959			
9.2026	1055.9458	1.3979			
11.8733	1149.1759	2.5844			

③ 회수율

㉠ Gallic acid가 존재하지 않는 대두식이섬유 분말 샘플 3개에 1 mg을 첨가하여 분석한 결과 측정값의 회수율은 평균 97.5 % 로 나타남. 또한 반복시험에 의한 정밀도 (% RSD)는 0.95로 나타남.

④ LOD & LOQ,

㉠ 표준용액을 위의 직선성 검정에서 사용하였던 농도로 제조하고 각각 3회씩 injection 하여 얻은 peak area로 얻은 slope값과 Y 절편값 계산식에 대입하여 LOD 0.387 mg/kg, LOQ 1.165 mg/kg을 추정하였음.

(마) 분석범위

① 결과적으로 범위는 직선성, 정밀도, LOQ를 종합적으로 판단하여 유효성이 유지되는

구간인 5 ~ 73 mg/kg의 농도 범위로 정하였음 .

(2) 에탄올 추출물 및 각 분획물 내 HPLC-MS의 지표성분 정성분석

(가) HPLC-MS 분석은 HPLC 1100 series (Agilent, USA)를 이용하여 수행하였음. 분석 조건은 시료를 water용매 1 mL에 녹이고 water(A)와 acetonitrile(B) (HPLC grade, Fisher scientific, USA)를 이동상으로 하였으며, 유속은 1.0 mL/min으로 하였고, 흡광도는 230 nm, 254 nm, 280 nm에서 분석하였음. 분석에 사용한 column으로는 Polaris 5 C18-A column(4.6×250 mm, 5 μm)으로 column 온도를 30℃로 설정하여 측정하였고 시료를 10μL 주입하였음. 이동상의 조건은 0-3분(95 % A, 5 % B), 10분(90 % A, 10 % B), 20분(80 % A, 20 % B), 25분(60 % A, 40 % B), 30분(20 % A, 80 % B), 40분(10 % A, 90 % B)로 설정하였음.

(나) NMR 분석으로 동정된 gallic acid를 에탄올 추출물 및 각 분획물 내 존재를 확인하기 위해 HPLC-MS를 이용하여 정성분석 진행 결과 에탄올 추출물, Ethyl acetate 분획물, 부탄올 분획물에서 그 존재가 확인되었고, 미량이지만 GC-MS 분석시 확인되었던 pyrogallol 존재도 확인 되었다.(Fig. 43. A-B).

(다) Gallic acid는 retention time 7.663~8.797 min 위치에서 확인되었으며, 해당 peak에서 모두 gallic acid의 분자량(170.1)을 확인하였음. HPLC 분석 과정에서 컬럼에 검출되기 위해 이온화하는 과정에서 H⁺ 또는 Na⁺가 결합하게 되는데 mass값을 측정할 경우 각각 분자량이 1과 23씩 증가하게 됨. 즉, Gallic acid 0.5~2 mg/mL의 농도에서는 H⁺와 Na⁺가 모두 결합한 형태인 MW 171과 193이 확인되었으며, 0.25 mg/mL의 농도에서는 MW 171이 확인되었음.

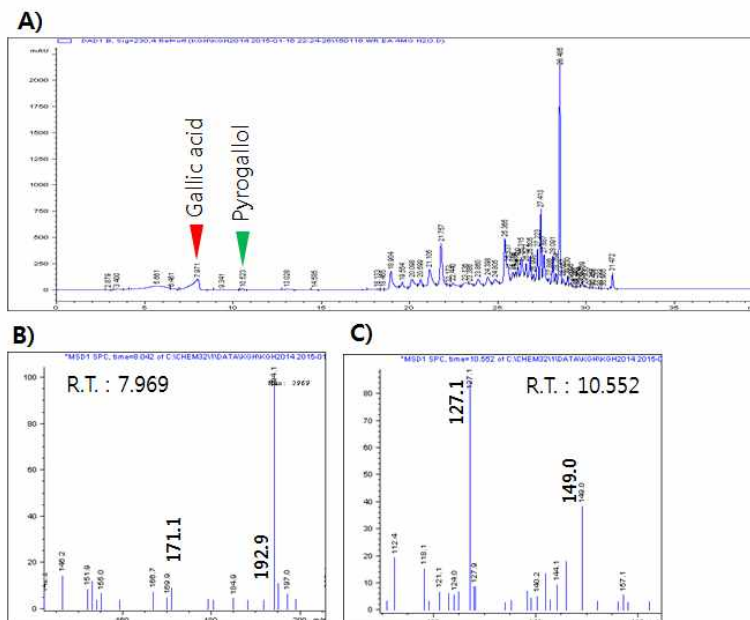


Fig 43. Analysis by HPLC of Ethyl acetate fractions (A)
Mass value of the gallic acid(B) and pyrogallol(C).

사. 지표 물질 효능 검증

(1) 검증방법

(가) Ethyl acetate 분획물에 대해 산·염기 추출 후 ethyl acetate를 이용하여 역추출 과정을 거쳐 확보된 gallic acid complex가 가지는 생물학적 개선 가능성을 확인하기 위해 항산화 효능 시험, tyrosinase inhibition assay, MMP-1 inhibition assay를 수행하였음.

(2) 항산화 효능 시험

(가) DPPH radical 소거능

① Gallic acid complex 100 μ g부터 1.6 μ g까지 serial dilution으로 희석한 후 각 용량에 대한 DPPH 활성산소 소거능을 측정한 결과 6.3 μ g 이상에서 DPPH 활성산소 소거능이 관찰되었으며, 특히 12.5 μ g부터는 Vit.C와 유사한 수준으로 ($p < 0.001$) 제거하는 것으로 나타남(Fig. 44.)

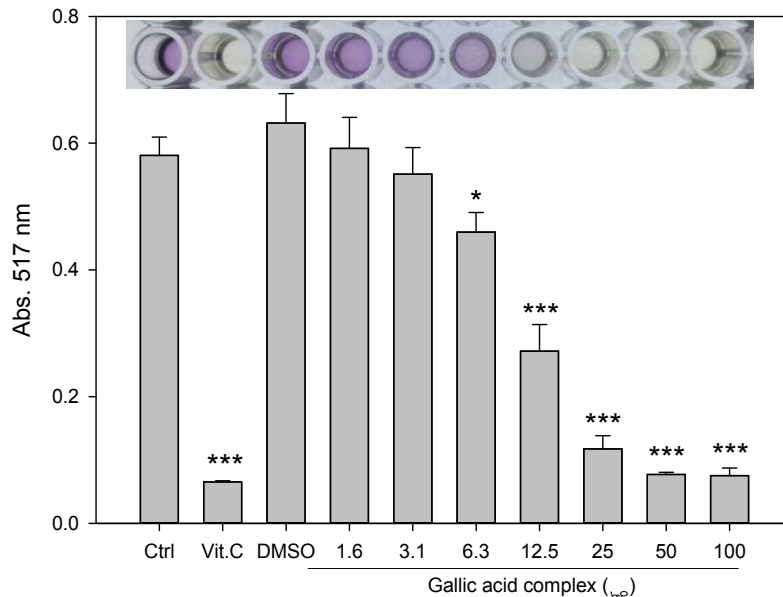


Fig 44. DPPH-scavenging activities of gallic acid complex.

(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

(나) Protein degradation 억제 효과

① Gallic acid complex 50 μ g부터 3.12 μ g까지 serial dilution으로 희석한 후 각 용량에 대한 protein degradation 보호효과를 관찰한 결과 최저 용량인 3.1 μ g까지도 유의한 효과가 확인되어 라디칼 공격으로부터 단백질을 보호하는 효능이 있는 것으로 확인되었음 (Fig. 45).

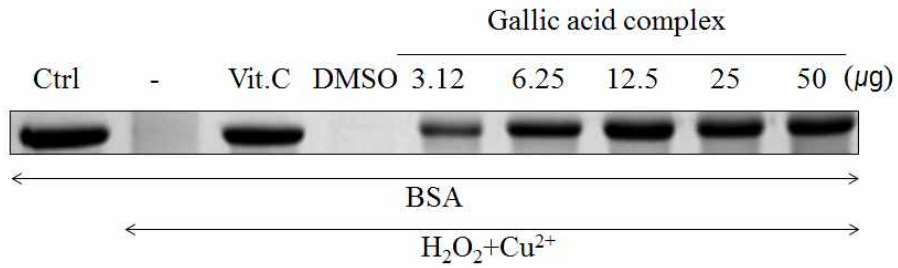


Fig 45. Protective effects of Gallic acid complex against radical-induced protein degradation.

(다) Tyrosinase 저해 효과

① Gallic acid complex 200 µg부터 6.25 µg까지 serial dilution으로 희석한 후 tyrosinase 활성 저해 능력을 측정된 결과 모든 용량에서 tyrosinase 활성 저해 능력이 관찰되었음(Fig. 46). 특히, 25 µg부터는 Vit.C와 유사한 수준으로 (p<0.001) 제거하는 것으로 나타났음.

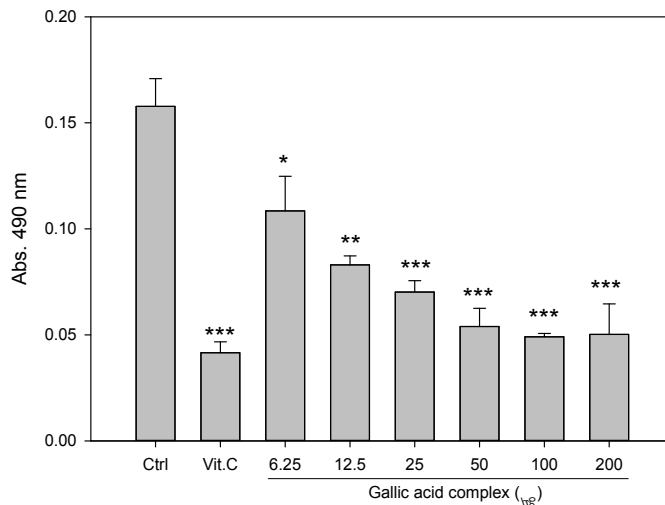


Fig 46. Tyrosinase inhibition activity of gallic acid complex.

(*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001).

(라) MMP-1 저해 효과

① Gallic acid complex 100, 50, 25 µg의 용량에 대해 MMP-1 저해 효과를 확인한 결과 모든 용량에서 MMP-1을 효과적으로 억제하는 것이 확인되었음(Fig. 47). 25 및 50 µg의 경우 반응 시작점부터 활성화된 MMP-1(positive control)에 비해 유의한 억제능을 갖는 것으로 나타났으나 30분 경과 후 뚜렷한 억제 효과는 보이지 않았으며, 60분 경과 시 positive control에 비해 절반 수준의 억제 정도를 보였음. 한편, 100 µg의 경우 경시적으로 MMP-1을 억제하여 60분 경과 후 MMP-1 inhibitor (negative control)과 유사한 수준까지 억제하는 것으로 나타났음.

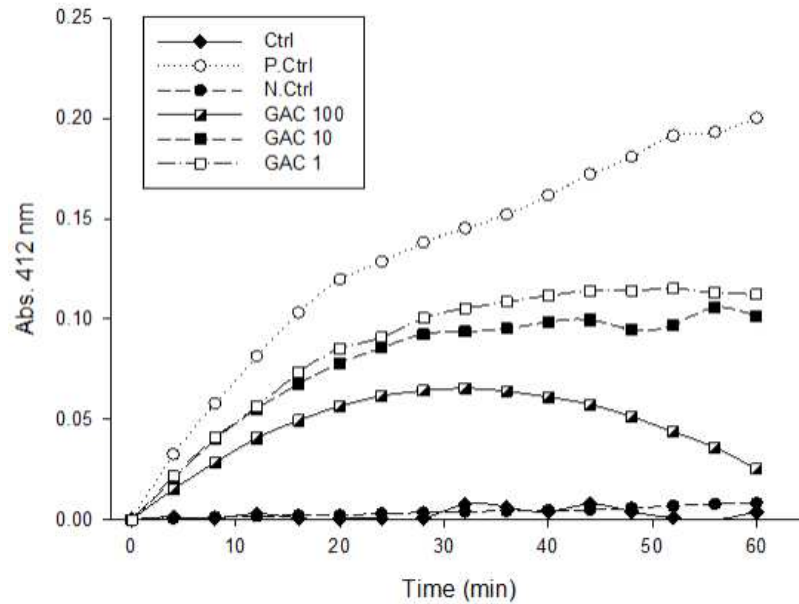


Fig 47. Inhibition of MMP-1 by gallic acid complex. Ctrl: non-treatment, P.ctrl: activated MMP-1, N.Ctrl: MMP-1 inhibitor, GAC: gallic acid complex (μg).

(마) Gallic acid complex의 정량적 평가

- ① Gallic acid complex의 생물학적 개선 효능을 정량적으로 평가하기 위해 항산화 효능 시험, protein degradation inhibition assay, tyrosinase inhibition activity, MMP-1 inhibition activity를 수행하였으며, 에탄올 추출물 및 용매 분획물의 평가 기준과 동일한 기준에 의거하여 각 시료를 비교하였음(Table 16).
- ② Ethyl acetate 분획물의 경우 에탄올 추출물 및 다른 분획물들 보다 높은 효능을 보이는 것으로 나타났음. gallic acid complex 및 ethyl acetate 분획물 중 다량의 gallic acid를 함유하고 있는 F4 분획물 또한 상당한 효능을 보였으나 ethyl acetate 분획물 보다는 낮은 생물학적 개선 효능을 보였음.
- ③ 따라서 Ethyl acetate 분획물의 F4 분획물 효능이 비단 gallic acid 단독 효과는 아닌 것으로 판단되었고 유효물질 보다는 유효성분과 동반하는 지표물질로서의 타당성이 강조되었음. 백장미 추출물의 효능은 gallic acid와 다른 물질들의 복합적인 결과로 판단됨.

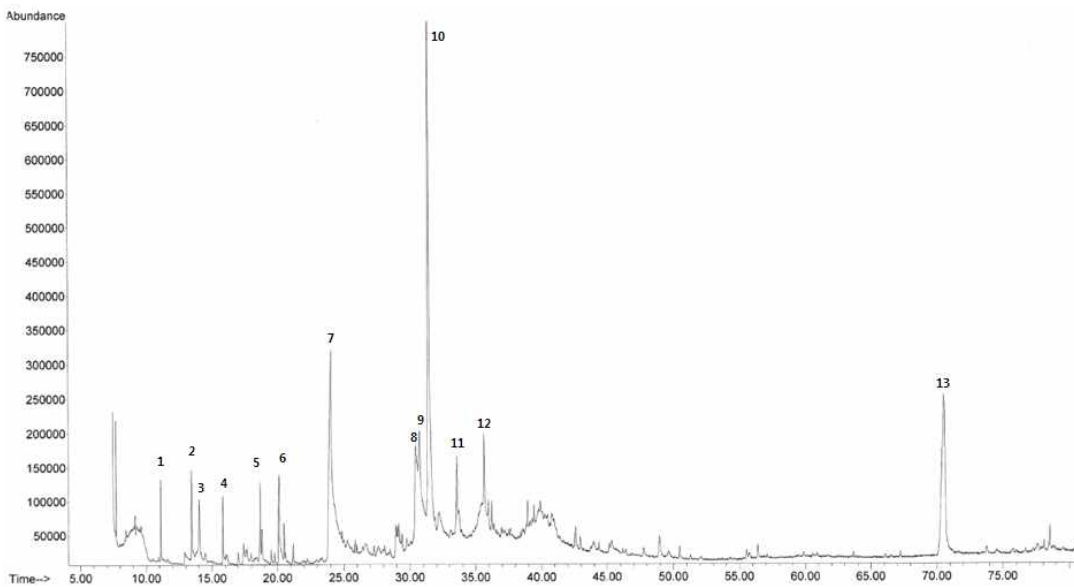
Table 13. Quantitative compare about biological improvement effects of ethyl acetate fractions and secondary fractions (F1~4) from white rose petal extracts.(Ascorbic acid or positive control for standard, 100 %)

항목	EA	GAC	F1	F2	F3	F4
DPPH radical 소거능	54.4	15.2	0.0	0.0	0.0	68.2
Protein degradaion 저해능	94.5	88.8	23.8	89.7	73.1	82.6
Tyrosinase 저해 효과	39.5	44.9	51.2	38.4	22.1	38.4
MMP-1 저해 효과	68.6	87.4	-	-	-	-
합계(MMP-1 저해능 제외)	188.4	148.9	74.9	128.1	95.2	189.2
평균	62.8	49.6	25.0	42.7	31.7	63.1
총점	257.0	236.3	-	-	-	-

아. 기타 유효물질

- (1) 비교적 높은 효능을 보인 butanol 및 water 분획물에는 gallic acid와 pyrogallol외에도 γ -sitosterol을 함유하고 있는 것으로 확인되었음. γ -sitosterol에 대한 기존 연구에 따르면 항진균, 항균, 항당뇨 기능이 있으며, 궤양, 기관지염, 당뇨, 심장질환에 대한 식물성의약품(phytomedicine)으로 사용하는 것으로 알려져 있음(Venkata Raman *et al.*, 2012). 본 연구에서 γ -sitosterol을 분리하지는 않았으나 이를 비교적 높은 비율로 함유하고 있는 분획물들이 긍정적인 효과를 보이고 있으며, 특히 가장 높은 비율을 함유하는 것으로 확인된 F2의 경우 ethyl acetate 및 gallic acid complex 등과 유사한 수준의 효능이 관찰되었음.
- (2) H₂O 분획 층에서 비교적 높은 비율로 butanoic acid가 분석되고 있으며, 연구에서 항아토피 기능(Lee *et al.*, 2013)을 비롯하여 항산화 효소 조절에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있음(Kumar *et al.*, 2009).

(가) GC-MS 크로마토그램



Peak	RT(min)	Library
1	11.103	3,4-diaminobenzonitrile
2	13.452	Silanol, trimethyl-, formate
3	14.038	Butanoic acid
4	15.840	2-Propanone, diethylhydrazone
5	18.692	3-Imino-3H,5H- [1,2,4] thiadiazolo [3,4-a] isoindole
6	20.121	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one
7	24.066	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)
8	30.451	Pyrogallol
9	30.735	Pyrogallol
10	31.430	4-(N-Methylamino)-6,7-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethylbenzo)indole
11	33.567	2-(2-phenylcyclopropanyl)thiophene
12	35.652	2-(3'-Hydroxypropyl)-3,5,6-trimethyl-1,4-benzoquinone
13	70.545	Gamma.-Sitosterol

자. 지표물질 분리공정의 확립 및 지표물질의 선정

(1) 지표물질 분리공정의 확립

(가) 본 연구를 통해 백장미 꽃잎 내 지표물질을 검출하기 위한 선택적 공정을 제시하였음. 백장미 꽃잎을 과쇄한 후 에탄올에 침지하여 추출한 뒤 에탄올 추출물을 준비하고, 이를 5종의 용매로 분획하여 ethyl acetate 분획물을 확보하는 과정은 동일하나 이후 과정은 향후 상황을 고려한 선택적 방법을 구축하였음(Fig. 48). 단순 분리 공정은 ethyl acetate 분획물을 대상으로 column chromatography 방법을 적용하여 함유되어 있는 물질들을 세분함으로써 지표물질을 분리하는 방법이며, 본 연구에서는 2차 분획물 중 F4에서 상대적으로 높은 함량의 gallic acid를 확인하였음. 또한, 단일 지표물질 분리 공정의 경우 산·염기 추출 방법 및 역추출 방법을 단계적으로 수행한 뒤 column chromatography법으로 재차 분리하고, 확보된 분획물에 대해 recycling HPLC를 이용하여 순수한 단일 지표물질을 분리해내는 방법이다. 본 연구에서는 NMR 분석을 통해 대표적인 지표물질인 gallic acid의 구조를 규명하여 제시하였음.

(나) 단순 분리 공정은 별도 장비 없이 실험실 수준에서 수행할 수 있으며, 분리 과정에서 지표물질의 손실을 최소화할 수 있다는 장점이 있으나 지표물질 외의 2차대사산물들이 상대적으로 다수 함유된 상태로 얻어진다는 단점이 있음. 그러나 2차 분획 후 확보된 F4에 대해 3차 분획을 실시한다면 보다 높은 순도의 지표물질을 획득할 수 있을 것으로 판단됨.

(다) 단일 지표물질 분리 공정은 단순 분리 공정에 비해 여러 단계를 거칠 뿐만 아니라 recycling preparative HPLC 등과 같은 별도의 분석 장비가 요구되며, 분리 과정에서 상대적으로 많은 지표물질의 손실이 야기됨. 그러나 단계적인 분리·정제 과정을 수행함으로써 단일 지표물질을 분리해 내는 동시에 분리된 물질의 구조 검증을 통

해 신뢰도 높은 데이터를 제시할 수 있다는 장점이 있음.

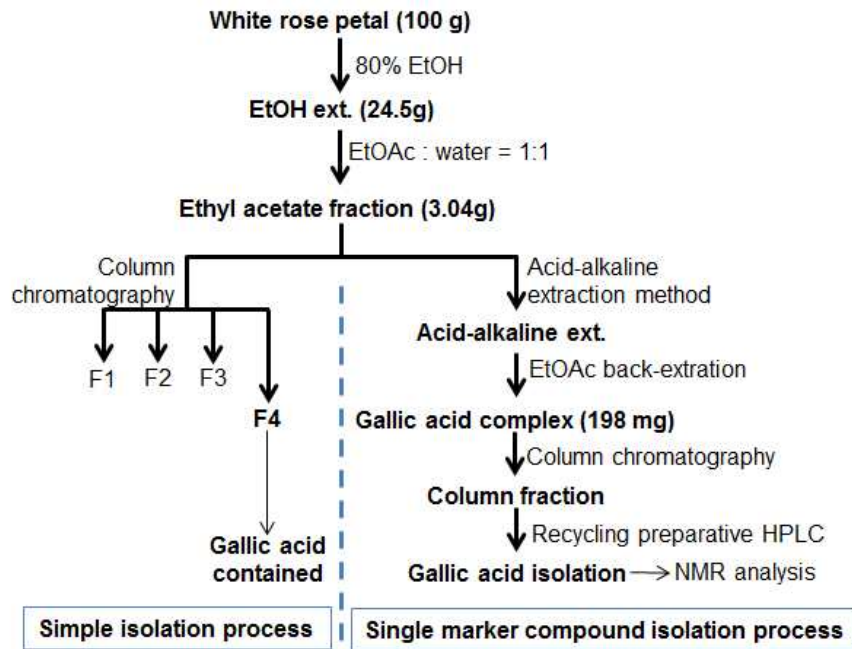


Fig 48. Separating process tree diagram simple isolation process and single marker compound isolation process.

(2) 지표물질(marker compound) 및 유효물질(lead compound)의 선정

(가) 지표물질을 함유하는 분획물의 생물학적 개선 효능

- ① 백장미 꽃잎 유래 추출물 및 분획물들에 대해 피부보호 및 개선 효과를 검증하기 위한 각종 시험을 수행하였으며, 이를 바탕으로 가장 높은 효능을 보이는 분획물과 그 분획물에 포함되어 있는 잠정적 지표물질을 확인하였음.
- ② 1차적으로 에탄올 추출물 및 분획물을 효능을 비교하면 MMP-1 inhibition 효능의 경우 에탄올 추출물과 water분획물이 다소 높은 효능을 보이기는 하였으나 전반적으로 ethyl acetate 및 butanol분획물에서 가장 좋은 효과가 확인되었음. 이와 같은 결과를 바탕으로 추출물 및 분획물의 효능을 정량적 기준에 따라 나열하면 $CHCl_3 < Hex < EtOH < water < BuOH < EA$ 로 나타낼 수 있음.
- ③ 가장 높은 효능을 보인 ethyl acetate 분획물의 2차 분획물 및 gallic acid complex의 효능을 비교하면 $F1 < F3 < F2 < gallic\ acid\ complex < EA < F4$ 의 순서로 정리할 수 있는데 높은 효능을 보이는 분획물 중 F2를 제외한 gallic acid complex, ethyl acetate, F4분획물은 상대적으로 높은 함량의 gallic acid를 함유하고 있었음.
- ④ 이와 같은 추출물 및 분획물에서 확인된 잠정적 지표물질은 gallic acid, pyrogallol, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, octadecadienoic acid, butanoic acid, γ

-sitosterol, linoleic acid으로 총 8종이며, 이중 gallic acid가 대표적인 지표물질로 선정 및 검증되었음.

4절 백장미 추출물을 이용한 피부 미용 기능성 평가

1. 효능평가 시스템 구축

가. *in vitro/in vivo* 주름개선 평가모델 최적화 및 지표선정

(1) *in vitro* 주름개선 평가모델

(가) 피부주름의 발생원인으로 피부교원질(collagen) 결핍과 elastin의 구조변형이 제시되고 있음. collagen과 elastin은 피부 진피를 구성하는 주요 단백질로서 피부구조와 탄력을 유지하는 역할을 함. collagen은 나이 들어 갈수록 생성이 감소하나 분해속도가 증가하게 되며, elastin은 자외선이 쬐여진 후 활성이 증가된 분해효소 elastinase에 의해 3차원 구조가 뒤틀러지는 것으로 알려짐. 따라서 collagen의 생성, 분해정도와 elastinase의 억제정도를 평가하기 위해 식약처 가이드라인 “피부의 주름개선에 도움을 주는 제품의 유효성평가를 위한 가이드라인”을 참고하여 평가모델을 최적화하고자 함.

- ① 세포내 콜라겐 생성시험(Collagen synthesis assay)
- ② 세포내 collagenase 억제시험(Collagenase inhibition assay) : 섬유아세포(fibroblast) 배양시 시료가 세포내 collagenase 생성억제 정도를 공시료액과 비교
- ③ Elastinase 활성 억제시험 (Elastase inhibition assay): 시험물질과 대조물질의 섬유아세포(fibroblast) elastase 활성 억제정도를 비교

(2) *in vivo* 주름개선 평가모델

(가) 식약처 가이드라인 “미용관련 기능성시험” 및 국내외에 알려진 주름 감소 효과의 측정법 및 biomarker를 참고하여 평가모델을 최적화하고자 함

- ① hairless mouse에 자외선을 조사하여 주름을 생성한 전후에 백장미 꽃잎 추출물(EtOH 추출물)을 경구투여한 후, 아래의 방법으로 control군과 비교하여 효능을 검증
- ② Hairless mice: Skh-1, 6주령
- ③ UV lamp: UVB (TL 20W/12U.V.)
- ㉞ 주름살 유도 - 1주일에 3번씩 UV등에 조사함. 첫 번째 주는 1MED씩, 2번째 주는 2MED씩, 3번째 주는 3MED씩, 4번째 주는 4MED씩 조사. 5주째부터는 4MED 씩 10주째까지 조사하여 주름살을 만듦.
- ㉟ 백장미 꽃잎 추출물(EtOH)의 투여
- 자외선 조사 전 4주와 조사 후 10주까지 하루 1회씩 14주간 경구투여를 시행
- ㊸ Skin impression

- 자외선 조사 후 1주일마다 silicon rubber로 등 부위에서 replica를 뜸.
- SZH stereomicroscope로 replica를 분석하여 주름 정도를 비교

주름개선 Biomarker	교원질
	탄력질
	Matrix metalloproteinases
	피부의 탄력성
	피부 주름살

나. *in vitro/in vivo* 미백효능 평가모델 최적화 및 지표 선정

(1) *in vitro* 미백효능 평가모델

(가) 비인체 시험자료로서 효력을 입증할 수 있는 시험법 중 “피부의 미백에 도움을 주는 제품의 유효성평가 가이드라인”을 참고하여 평가모델을 최적화하고자 함

- ① *in vitro* tyrosinase 활성 억제시험
- ② 세포내 melanin 생성 억제효능 확인

(2) *in vivo* 미백효능 평가모델

(가) 미백효과를 측정하기 위해서 가장 많이 사용되고 있으며, UV에 의한 피부내 변화 양상이 인체와 가장 유사한 모델인 brown guinea pig를 적용하여 미백효능 평가를 최적화하고자 함.

- ① Brown guinea pig에 UVB를 조사함으로써 복잡한 melanogenesis과정이 일어나 현상적으로 pigmentation된 상태를 관찰할 수 있는데, 백장미 꽃잎 추출물(EtOH)을 UV에 의한 pigmentation이 일어나기 전후에 투여하여 melanogenesis의 억제를 통한 색소침착 억제 및 침착된 색소의 제거 효과를 평가하여 효능을 검증
- ② Brown guinea pig 9주령
- ③ UV lamp: UVB (TL 20W/12U.V.)
 - ㉠ 색소침착의 유도 - 실험동물의 등을 면도한 후 피부에 6개의 1.5 cm x 1.5 cm 자외선 조사 부위를 만들고 1일 1회 3일 간격으로 연속 시행하여 자외선의 총 조사량이 500-1000 mJ/cm²가 되도록 함
 - ㉡ 백장미 꽃잎 추출물(EtOH)의 투여 - 자외선 조사 전 4주와 조사 후 4주까지 하루 1회씩 8주간 경구투여를 시행
 - ㉢ 육안 또는 기기(chromameter)를 이용하여 변화 분석 - 색소침착부위의 퇴색정도를 1주일 간격으로 관찰
 - ㉣ 표피 내의 melanocyte proliferation 억제효과 분석 - DOPA 양성 melanocyte cell 수 측정

미백효능 Biomarker	tyrosinase 활성도
	melanin 생성량
	피부색

다. *in vitro/in vivo* 보습효능 평가모델 최적화 및 지표 선정

(1) *in vitro* 보습효능 평가모델

(가) 표피의 수분 증발이 ceramide 및 자연보습인자의 함량 변화와 역의 상관관계가 있음이 여러 연구 결과에서 보고되고 있어, 표피세포 keratinocyte, laranocyte 및 fibroblast 중 주요피부세포인 keratinocyte에 대해 creamide 유지효능을 확인함으로써 보습효능 평가를 최적화하고자 함

① 세포내 및 동물 피부 내 ceramide 유지효능 확인

(2) *in vivo* 보습효능 평가모델

(가) 국내외에 알려진 보습효과의 측정법 및 biomarker를 참고하여 평가모델을 최적화함

① C57BL/6N mice: 6주령

② 백장미 꽃잎 추출물(EtOH)의 투여 후 피부 조직 내 경시별 ceramide 등의 보습인자와 피부 표면의 보습상태로 수분 손실량(TEWL)을 측정

㉠ 피부 표면의 보습 상태 측정 - microbalance를 이용하여 수집한 표피의 무게를 측정

㉡ ceramide 함성량 측정 - 채취된 생검 조직을 0.5 % trypsin-EDTA in PBS 용액에서 1시간 동안 배양한 후 epidermis를 취하여 [¹⁴C]Serin과 16시간 배양하여 ceramide를 포함한 sphingolipids에 metabolic labeling함. HPTLC로 분획하여 분리된 ceramide를 scintillation counter로 방사활성을 측정하여 Lowry법에 의한 단백질 정량과 함께 cpm/ μ g protein로 표시

㉢ ceramide 함량변화 측정 - 생검조직에서 분리된 표피에서 직접적으로 유기 용매를 이용하여 지질을 추출하고 TLC와 적절한 전개액을 사용하여 ceramide 및 타 지질을 분획함. TLC scanner로 ceramide 및 타지질 성분을 정량 분석하고 사용한 조직의 단백질 정량과 함께 % / μ g protein으로 표시

㉣ 자연보습인자 측정법 - 표피에서 직접적으로 적절한 용매를 이용하여 수용성 물질을 추출하고 자연 보습인자 중 아미노산은 amino acid analyzer를 이용하고, PCA와 UCA등은 HPLC를 이용하여 분석

피부 표면의 보습 상태(수분 손실량)

	ceramide
	- 보조 biomarker 1: serine palmitoyltransferase, cerebrosidase, sphingomyelinase, ceramide synthase 효소의 발현 및 활성도
보습효능	- 보조 biomarker 2: glucosylceramide synthase, dphingomyelin synthase, ceramidase 효소의 발현 및 활성도
Biomarker	자연보습인자
	- 보조 biomarker: γ -glutamyl cyclotransferase, histidase, ornitine carbamoyl-transferase, aspartate 4-decarboxylase 효소의 발현 및 활성도

라. *in vitro/in vivo* 아토피개선 평가모델 최적화 및 지표 선정

(1) *in vitro* 아토피개선 평가모델

(가) 비만세포는 세포 표면을 덮고 있으며 국소 감염에 대하여 면역계가 경계하도록 도와주는데, 이들이 활성화 되면 이미 만들어져 있는 과립들 내에 저장되었던 화학물질을 분비하고, 활성화된 후에는 leukotriene과 cytokine 들의 합성함으로써 염증 반응을 일으킴. 따라서 비만세포는 특히 알러지 반응을 일으키는데 핵심적인 역할을 하는 것으로 인식되어 왔으며 과민반응 및 염증반응에도 관여하는 것으로 알려져 있음. 이를 토대로 국내외에 알려진 아토피개선 측정법 및 기존의 연구결과들을 참고하여 아토피개선 평가모델을 최적화하고자 함

(나) 비만세포 탈과립(mast cell degranulation): 시험물질의 과민반응 억제효과가 비만세포의 탈과립을 차단하는 작용에 의한 것인지를 규명하기 위해 RBL-2H3 cells로부터의 β -hexosaminidase 유리에 대한 억제효능을 평가

(2) *in vivo* 아토피개선 평가모델

(가) 식약처 가이드라인 “알레르기 관련 기능성시험”에 준하여 국내외에 알려진 아토피개선 효과의 측정법을 참고하고 선별함으로써 평가모델을 최적화하고자 함

① ICR mice(6주령) 및 NC/Nga mice

② 백장미 꽃잎 추출물(EtOH)은 급성 알러지 유발 30분 전에 경구 투여함. 만성 아토피 피부염에 대해서는 25일간 매일 경구투여함

㉠ Compound 48/80 유도 전신성 급성 알러지 반응 - 치사량의 mast cell degranulator인 compound 48/80 (8 - 9 mg/kg, 5 mL/kg)을 복강내 주사하고 60분간의 사망률을 검사하여 50% 이상의 동물을 생존시키는 용량을 제시

㉡ Compound 48/80 유도 국소성 급성 알러지 반응- mast cell degranulator인 compound 48/80 (50 μ g[50 μ l]/site)을 피내(또는 피하)로 주사하고 60분간의 scratching behaviors(가려움증)을 측정하여 가려움증을 유의하게 줄여 주는 용량을 제시.

㉢ 전신성 및 국소성 급성 알러지 반응에서의 효과를 토대로 5 mL/kg의 1 % Evan's blue를 정맥내로 주사한 후 100 mL/kg saline으로 전신의 혈액을 관류제거함. 주사부위 피부를 절제하여 피하출혈반점 크기 측정함. 출혈반점 포함 피부를 잘라내어 3일간 formamide로 용출시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하여 Evan's blue를 정량함으로써 부종완화 효능을 제시

㉣ NC/Nga 마우스에서 DNCB 유도 만성 아토피 피부염 - NC/Nga 마우스에 25일간 매일 백장미 꽃잎 추출물(EtOH)을 투여. 4일째에 마우스의 등부위를 clipper와 전기면도기로 제모하고 5일째의 시험물질 투여 30분 후 DNCB 용액 (150 μ l)을 제모한 등부위에 도포함. 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25일째에 시험물질 투여 30분 후 DNCB (0.2 %) 용액(150 μ l)을 등부위에 반복 도포함. 26일째에 1시간 동안 scratching behavior(긁는 횟수)를 측정하고, 육안관찰을 통해 농양성 염증, 출혈,

습진, 홍반, 가피탈피 등의 피부염 관련 병변을 scoring함. 조직병리학적 관찰을 위해 H&E 염색으로 피부반응에 대한 조직병리학적 소견 scoring하고, toluidine blue 염색으로 mast cell degranulation 정도를 관찰함. 혈청을 얻어 total IgE 분석하고, 효과가 인정될 경우 혈청 TNF- α , IL-4, IL-6 등의 cytokines과 histamine을 분석

2. *in vitro* 효능 확인

가. 세포독성 및 항산화 효능의 분석

(1) 시험법

- (가) Cytotoxicity (MTT) assay를 통해 세포독성을 확인
- (나) DPPH-scavenging assay를 통해 항산화 효능을 확인
- (다) Protein degradation assay를 통해 항산화 효능을 확인
- (라) Lipid peroxidation assay를 통해 항산화 효능을 확인
- (마) NO-scavenging assay를 통해 항염증 반응에 대해 분석
- (바) Gene expression of antioxidant and inflammatory enzymes 분석을 통해 항염증 및 항산화 효능 분석

- (2) 상기의 실험들을 통해 백장미 꽃잎에 대한 EtOH 추출물, 효소추출물 및 고온고압 추출물 중에서 피부 미용 기능성 평가에 적합한 추출물을 선정하고, *in vitro/in vivo* 주름개선 평가모델에 적용할 최종적인 용량을 설정함

(3) Cytotoxicity (MTT) assay

- (가) 세포는 미토콘드리아의 전자전달계 과정을 통해서 필요한 에너지를 생산하게 되는데 이 과정에서 전자전달계내의 succinate dehydrogenase (SDH)가 tetrazolium salt를 분해하여 insoluble formazan을 생성하게 됨. 이 원리를 이용하여 Cell counting kit-8 (CCK-8)을 이용하여 formazan의 생성량을 측정함으로써 세포 생존율을 측정하였음.
- (나) Cell viability assay를 위해 mouse RAW 264.7 macrophages에 백장미 꽃 추출물을 각각 처리하여 24시간 동안 배양한 뒤, 각 well에 CCK-8 solution을 첨가하고 microplate-ELISA reader로 450 nm에서 formazan의 흡광도를 측정함.
- (다) 각각의 시료를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 처리한 결과 모든 시료에서 control군과 비교했을 때 유의한 차이를 보이지 않아 이 농도에서 세포에 대한 직접적 독성은 없는 것으로 확인됨(Fig. 49).

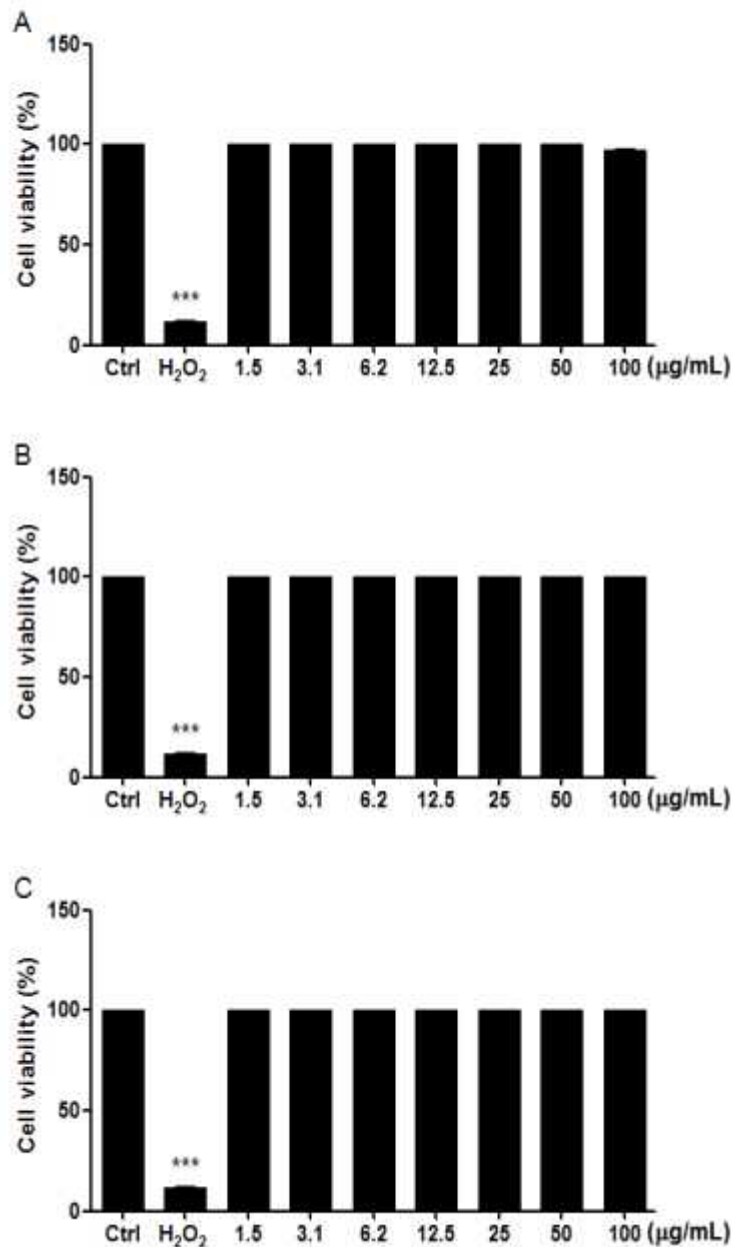


Fig 49. Cytotoxicities of white rose petal extracts in MTT assay.

A: EtOH, B: Enzyme, C: HTHP.

*Significantly different from control group ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001).

(4) DPPH-scavenging assay

(가) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 진한 보라색 화합물이지만 radical 소거활성이 있는 항산화제에 의해 정량적으로 탈색되므로 항산화활성을 쉽게 측정할 수 있음. 이 radical에 의한 소거활성은 지질과산화 억제활성을 비롯한 항산화 활성과 상관관계를 보이므로 항산화제 탐색에 널리 이용됨.

(나) 이에 본 연구에서는 백장미 꽃이 가지는 DPPH 활성산소 소거능을 확인하기 위해

DPPH solution과 EtOH, Enzyme, HTHP 추출물의 반응을 검출하였으며, 양성대조군으로는 vitamin C (Vit. C, 50 μm)를 처리 후 microplate-ELISA reader (SpectraMax plus 384, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 활성산소 소거능을 확인하였음.

(다) 실험결과 각 시료의 농도를 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 serial dilution하여 처리하였을 때 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 유의한 활성산소 소거능이 관찰되었으며, 3가지 추출물 모두 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 완전한 소거능을 보임(Fig. 50).

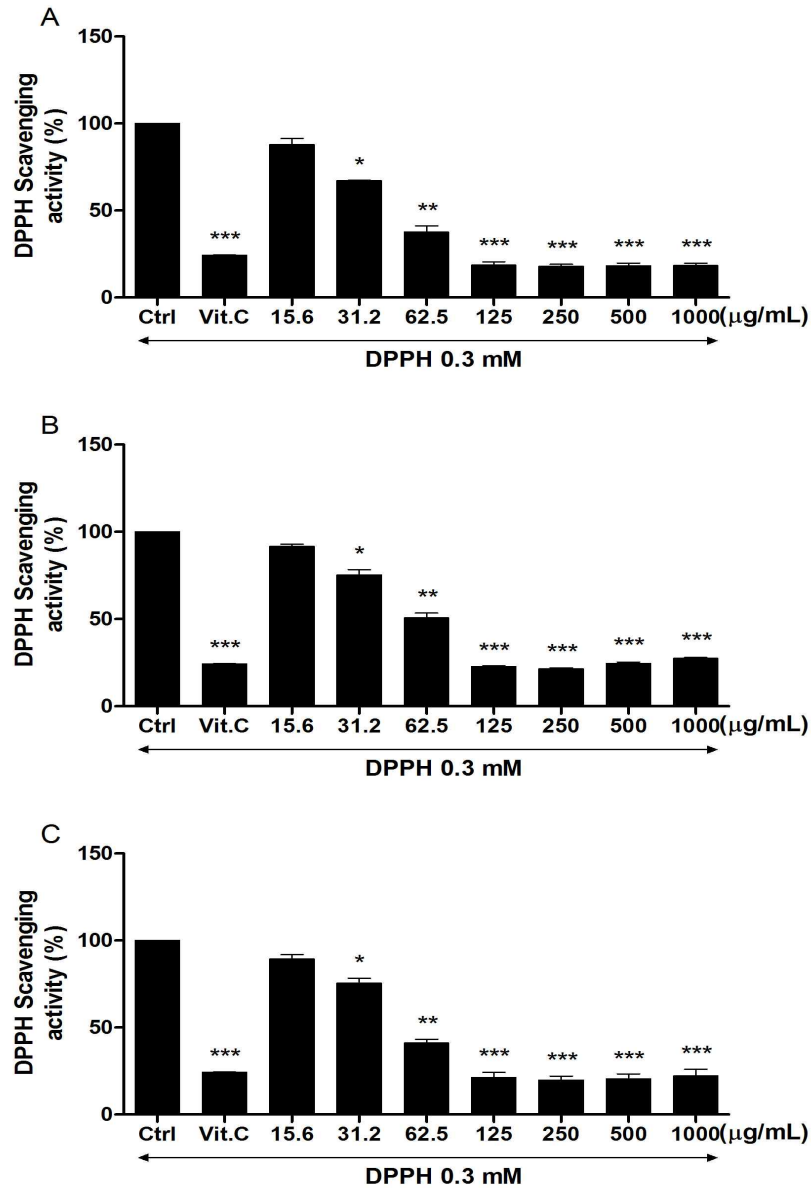


Fig. 50. DPPH-scavenging activities of white rose petal extracts.

A: EtOH, B: Enzyme(Pectinex® SMASH XXL), C: HTHP, D: Hot water, E: Supercritical fluid.

*Significantly different from control group ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001).

(5) Protein degradation assay

- (가) Reactive oxygen species (ROS)에 의한 손상으로부터 bovine serum albumin (BSA)과 같은 단백질이나 효소를 보호하는 항산화 물질의 효과를 금속이온촉매 반응을 이용해 확인하는 방법으로 백장미 꽃잎 추출물의 금속 이온촉매 산화억제력을 확인하고자 함.
- (나) Free radical의 생성을 유도하기 위해 CuSO_4 (1 mM)와 H_2O_2 (10 mM)을 첨가하여 금속이온촉매반응을 이용하였으며, free radical을 생성 후 추출물 및 분획물이 가지는 BSA protein의 보호효과를 SDS-polyacrylamide gel에 전기 영동하여 확인하였음. 양성대조군으로는 Vit. C (50 μm)를 처리함.
- (다) 각 시료를 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 serial dilution하여 처리한 결과 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 protein 보호 효과가 관찰되었는 바, EtOH와 Enzyme 추출물이 HTHP에 비해 다소 우수한 것으로 보임(Fig. 51).

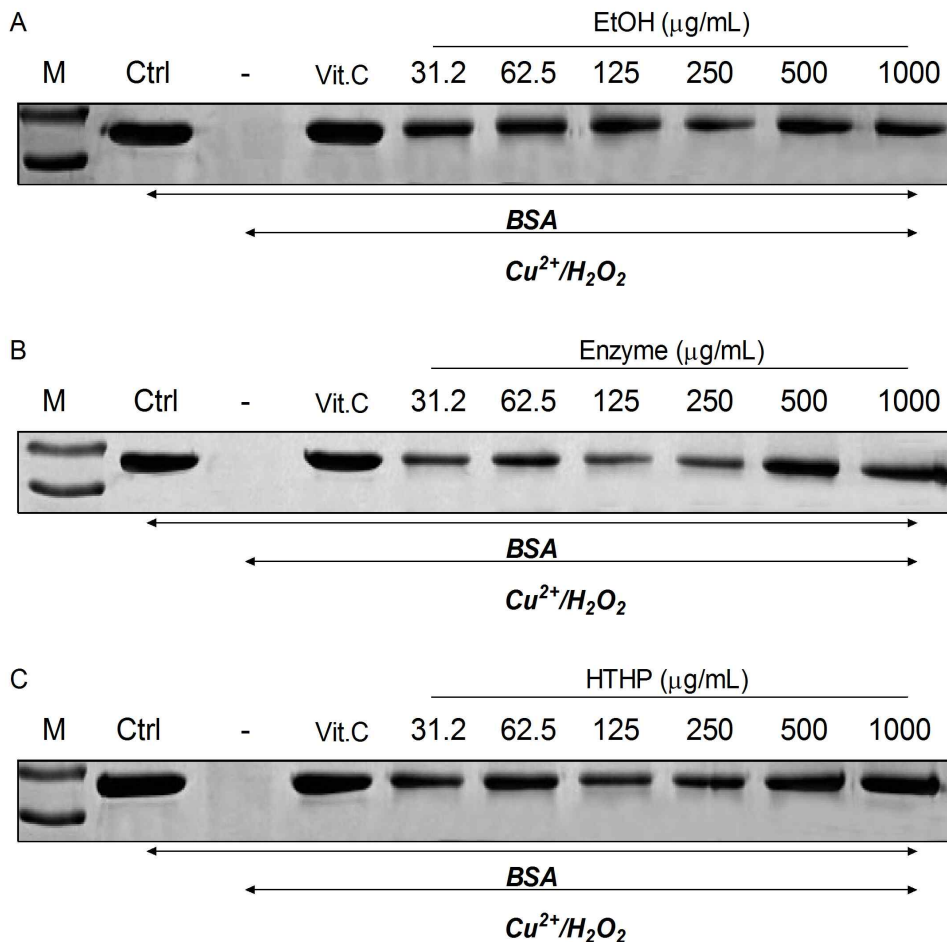
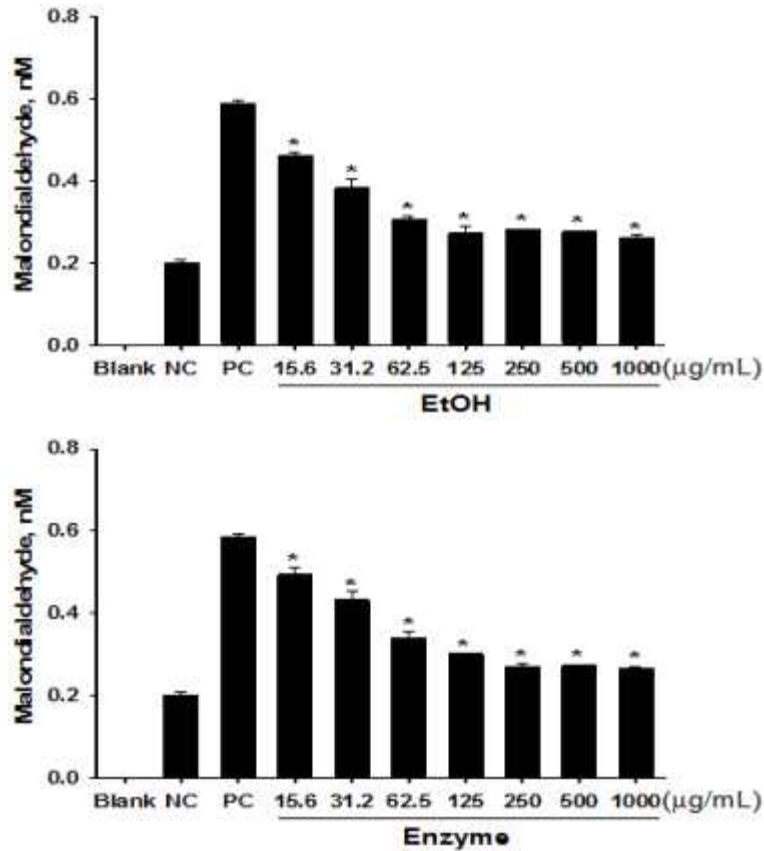


Fig. 51. Protective effects of white rose petal extracts against radical-induced protein degradation. A: EtOH, B: Enzyme(Pectinex® SMASH XXL), C: HTHP.

(6) Lipid peroxidation assay

- (가) 산화적 radical reaction 촉진 전이금속인 iron에 의한 세포막 lipid peroxidation의 지표로서 thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS), 즉 malondialdehyde (MDA)의 함량을 정량함으로써 3종의 백장미 추출물에 대한 산화반응성 지질 손상을 확인함.
- (나) 마우스의 뇌조직을 균질화하여 지질손상 유발물질인 산화반응 촉진물질인 ferric chloride (FeCl_3 , $75 \mu\text{m}$)를 혼합하여 37°C 에서 30분간 산화반응을 유도함. 산성화한 균질액에 TBA 반응용액을 첨가하여 반응시킨 후, 532 nm 에서 흡광도를 측정하여 MDA 함량을 확인함.
- (다) 각 시료를 $1,000 \mu\text{g/mL}$ 의 농도부터 serial dilution하여 처리한 결과 모두 $125 \mu\text{g/mL}$ 의 농도부터 확실한 MDA 생성 억제가 확인됨(Fig. 52).



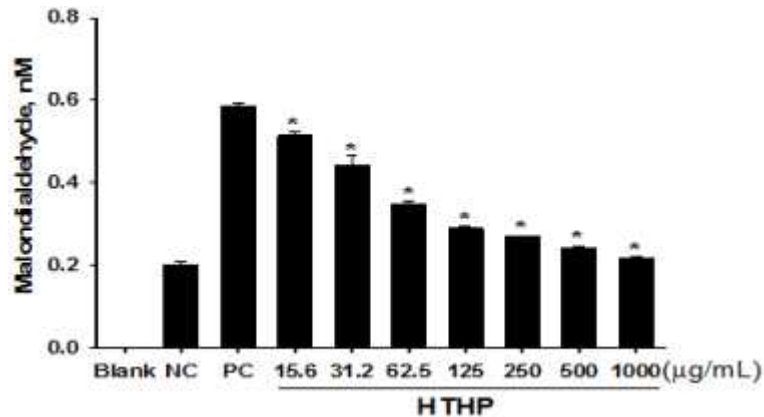


Fig. 52. Inhibitory activities of white rose petal extracts on radical-induced lipid peroxidation. *Significantly different from positive control group ($P < 0.05$).

(7) NO-scavenging assay

- (가) Nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthesis (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 만들어지며 혈관 이완인자 endothelium derived relaxing factor (EDRF)로서 혈관의 항상성 외에 발기유도, 항혈전, 항균, 기억력 증진 등 다양한 생리작용을 나타냄. 그러나 염증반응과정에서 inducible NOS로부터 다량으로 유리된 NO는 세포 및 조직손상을 야기함.
- (나) 이에 본 연구에서는 백장미 추출물의 항염증 작용을 확인하기 위해 RAW 264.7 macrophages를 lipopolysaccharide (LPS)화 시험물질을 24시간 처리한 후, Griess reagent를 첨가하여 10분간 반응시킨 다음, microplate-ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 NO 생성을 측정함.
- (다) 각 시료를 100 µg/mL의 농도부터 serial dilution하여 처리한 결과 모두 25 µg/mL의 농도에서 NOS 억제제인 L-NMMA와 유사한 억제효과를 나타냈으며, 그 이상의 농도에서는 용량의존적으로 억제효능이 증가하였음(Fig. 53).

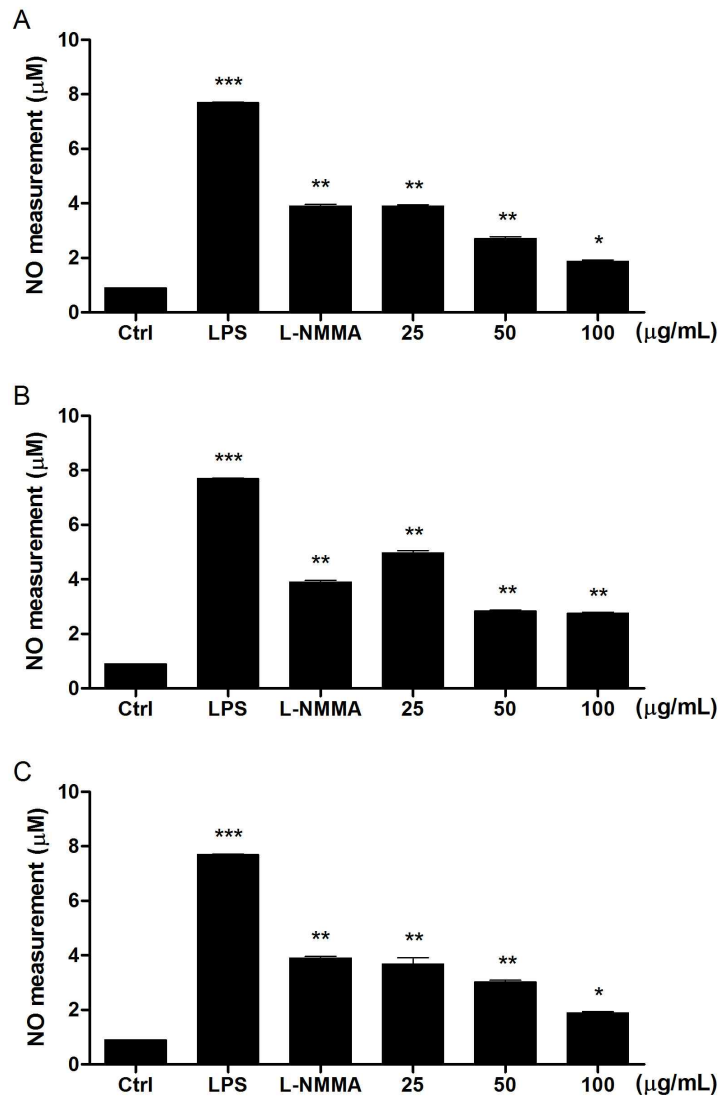


Fig 53. NO-scavenging activities of white rose petal extracts.

A: EtOH, B: Enzyme(Pectinex® SMASH XXL), C: HTHP.

*Significantly different from control group ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001).

(8) Gene expression of antioxidant and inflammatory enzymes

(가) 진핵생물에 존재하는 superoxide dismutase 2 (SOD2; MnSOD)는 주로 미토콘드리아 작용하는 지질의 과산화 방지 및 항산화 효소로서 활성산소를 제거하는 능력을 가지고 있음. 이에 비해 iNOS는 염증반응에 따라 다량의 NO 생성하여 항균작용은 물론 세포/조직손상을 유발하는 효소임. 따라서 냉발현을 증가시키고, iNOS 발현량을 억제하면 세포와 조직손상은 물론 노화 방지에 효과적인 것으로 알려져 있음.

(나) 이에 본 연구에서는 백장미 추출물이 세포 내 SOD2 및 iNOS 유전자의 발현에 미치는 영향을 quantitative real-time PCR (qPCR)로 분석함.

(다) RAW 264.7 macrophages에 LPS와 시험물질 (50 µg/mL)을 처리 후 SOD와 iNOS 유전자 발현을 분석한 결과, 두 유전자 모두 백장미 추출물에 의해 억제되는 경향

을 나타냄(Fig. 54). 특히 염증반응 유도 iNOS 유전자에 대해 EtOH 추출물이 다른 시료에 비해 억제효능이 더 강한 것으로 확인됨.

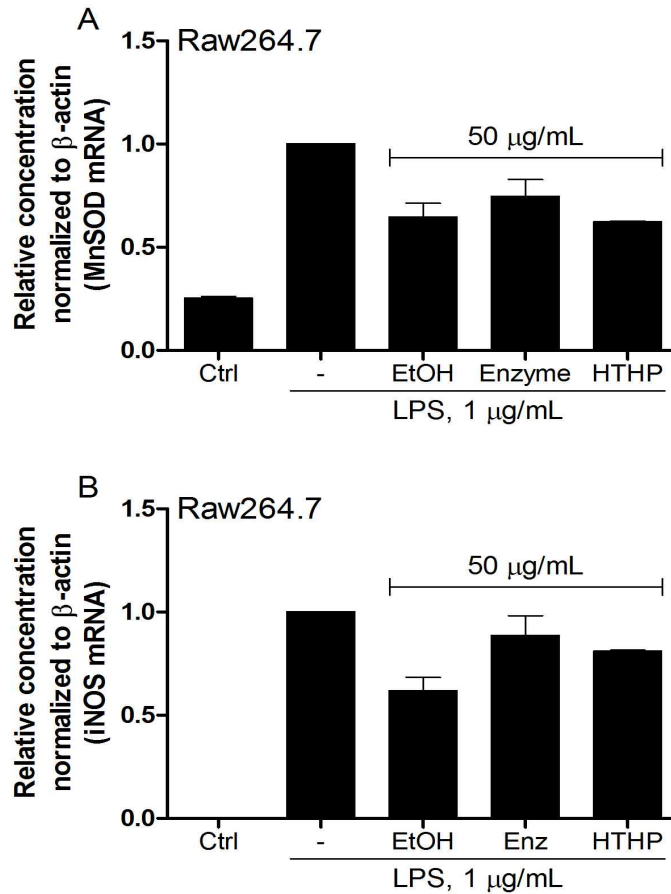


Fig 54. Effects of white rose petal extracts on the mRNA expression in RAW 264.7 macrophages. A: SOD2, B: iNOS.

(9) 결과

(가) 제공된 3종의 백장미 추출물[에탄올 추출물(EtOH), 효소처리 추출물(Enzyme) 및 고온고압 추출물(HTHP)]에 대한 Cytotoxicity (MTT) assay, DPPH-scavenging assay, Protein degradation assay, Lipid peroxidation assay, NO-scavenging assay, Gene expression of antioxidant and inflammatory enzymes 분석결과, 대부분의 지표에서 EtOH > Enzyme > HTHP 추출물의 순으로 효과적이었음.

나. 주름개선: 세포내 콜라겐 생성 및 collagenase 억제시험(collagenase inhibition assay)

(1) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 유전자 발현 확인

(가) MMP-1은 interstitial collagenase로도 알려져 있으며, 세포 외기질의 분해를 야기하는 생리적 활성화에 중요한 역할을 함. 또한, 피부 탄력을 유지하는 collagen을 분해

에 관여하는 대표적인 효소임.

- (나) Human fibroblast 세포주인 CCD986SK 세포를 대상으로 시험물질 처리 후 MMP-1 유전자의 변화를 확인하였으며, 이를 통해 collagenase 활성 억제를 비롯하여 잠재적인 피부 주름 개선 효과를 검증하고자 하였음. EtOH, Enzyme, HTHP 추출물을 각각 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 경과 후 유전자 발현 양상을 비교하였으며, stimulator로서 PMA(5 μm)를 사용하였음.
- (다) 실험 결과 세 추출물 모두 PMA로 유도된 MMP-1 유전자의 유의한 발현억제효능이 관찰되지 않았으며 EtOH군의 고농도군에서 MMP-1억제의 효능이 미약하게 관찰되었음(Fig. 55).

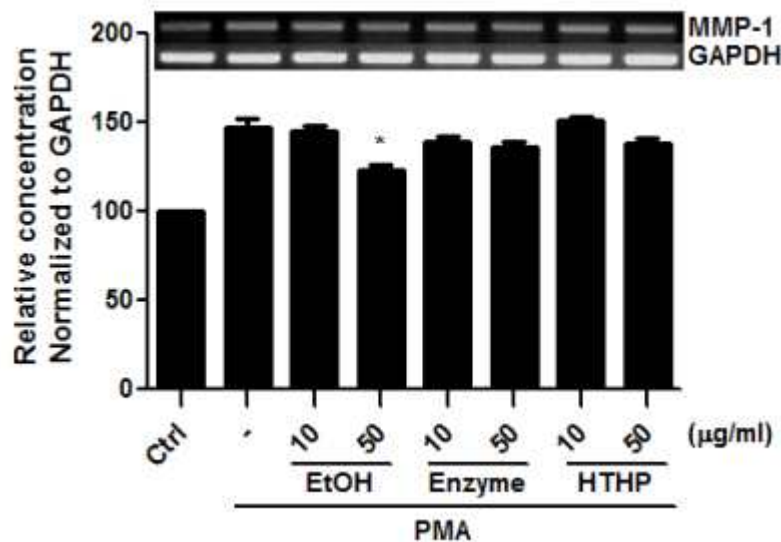


Fig. 55. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) gene expression by white rose extracts. A:EtOH, B: Enzyme, C: HTHP. *Significantly different from PMA only group ($P < 0.05$).

(2) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 효소 활성 저해능 확인

- (가) 세 추출물에 의한 MMP-1 유전자 발현 억제효능을 확인한 결과 유의한 결과를 얻지 못하여 직접적인 효소활성 억제 가능성을 타진하고자 추가적인 실험을 수행하였음.
- (나) 효소 활성 억제 정도는 기질만을 포함하고 있는 Ctrl군을 비롯하여 활성화된 MMP-1 효소 시험군(P. Ctrl) 및 MMP-1 inhibitor가 함유된 시험군(N. Ctrl)과 비교하여 평가하였음. 각 샘플의 농도는 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 세 군으로 설정하였음.
- (다) 세 가지 추출물 모두 약 30분까지는 MMP-1 효소의 활성을 억제하지 못하였으나 30분 이상 반응을 지속했을 때 종류와 농도에 따라 상대적으로 억제 가능성을 나타내기도 하였음. 즉, EtOH 추출물과 enzyme 추출물의 경우 30분 이상 반응시켰을

때 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 P. Ctrl보다 상대적으로 효소의 활성이 낮아지는 것이 확인되었으며, HTHP 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 효소 억제 가능성이 확인됨(Fig. 56).

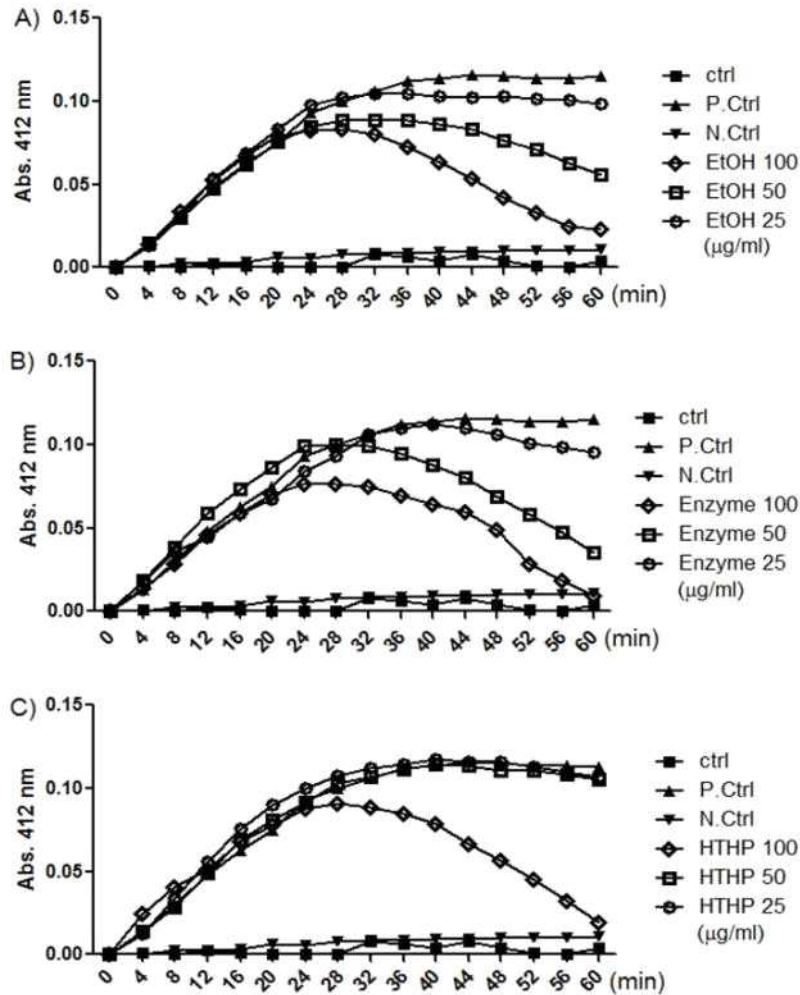


Fig. 56. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) activity inhibition by white rose extracts.
A: EtOH, B: Enzyme, C: HTHP.

다. 주름개선: Elastase 활성 억제시험 (Elastase inhibition assay)

- (1) Elastase는 피부 탄력을 관장하는 elastin을 분해하는 효소로서 기존의 많은 주름 개선 성분이 이 효소를 억제하는 기전을 가지므로 이 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하고자 하였음.
- (2) 이에 백장미 꽃 시료와 150 mM Tris-HCl (pH 8.0), *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide 및 elastase를 혼합하고 25 °C에서 30분간 반응시킨 다음, microplate-ELISA reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- (3) 각각의 시료를 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로부터 serial dilution으로 처리했을 때, EtOH 추출

물은 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터, Enzyme 추출물과 HTHP 추출물은 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 유의한 elastase 활성 저해능력이 관찰된 바, EtOH > Enzyme > HTHP 추출물 순으로 우수하였음(Fig. 57).

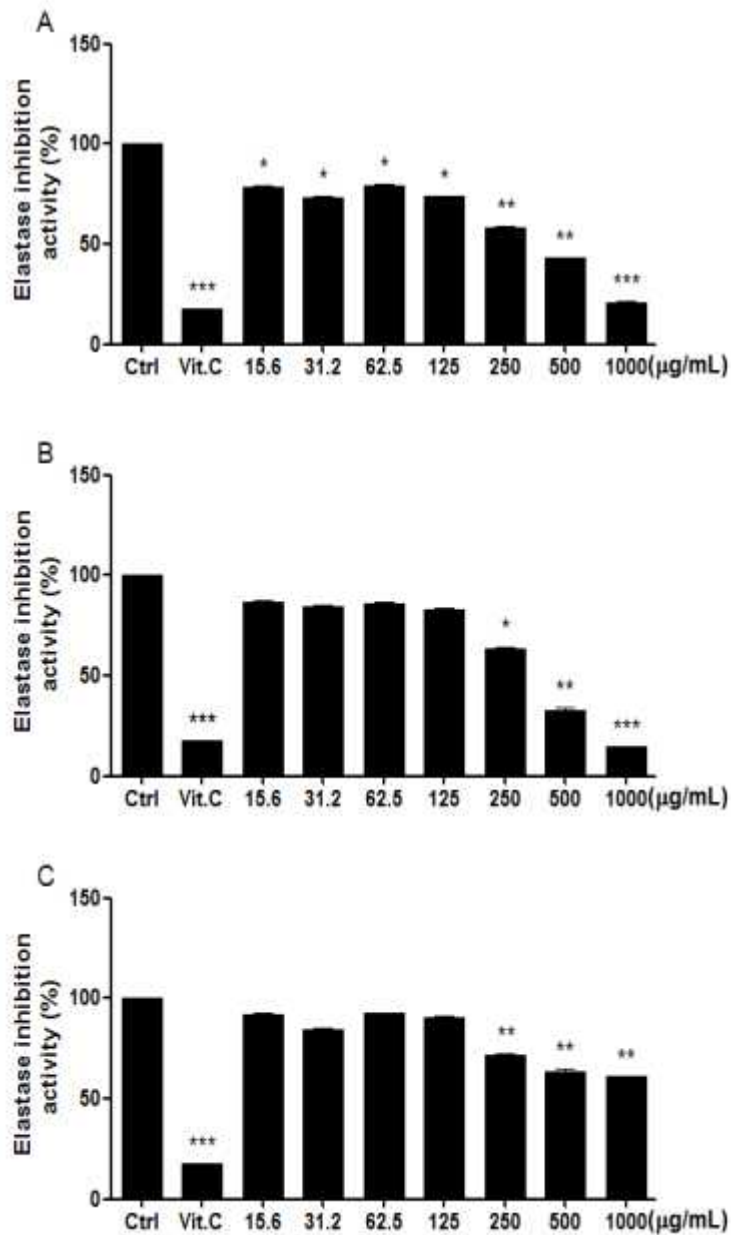


Fig 57. Elastase inhibition by white rose extracts. A: EtOH, B: Enzyme, C: HTHP.

*Significantly different from control group ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001).

라. 미백효능: *in vitro* tyrosinase 활성 억제 및 melanin 생성 억제 효능시험

(1) Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에

관여하는 효소로서 기존의 많은 미백성분이 이 효소를 억제하는 기전을 가지므로 이 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하였음.

- (2) 이에 각 시료와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), L-tyrosine 및 mushroom tyrosinase를 혼합하여 37 °C에서 30분간 반응시켰으며, microplate-ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 억제력을 확인하였음.
- (3) 고농도의 Vit.C (500 μm) 이상의 효능을 보이는 시험물질의 농도를 확인하기 위해 500 μg 농도부터 serial dilution으로 처리 후 tyrosinase 활성 저해 능력을 측정한 결과 Enzyme 및 HTHP 추출물의 경우 최소 62.5 μg 까지 저해효능이 확인된 반면 EtOH 추출물의 경우 3.2 μg 까지 유의한 저해능이 나타나 상대적으로 가장 높은 생리활성을 가지는 것으로 판단됨(Fig. 58).

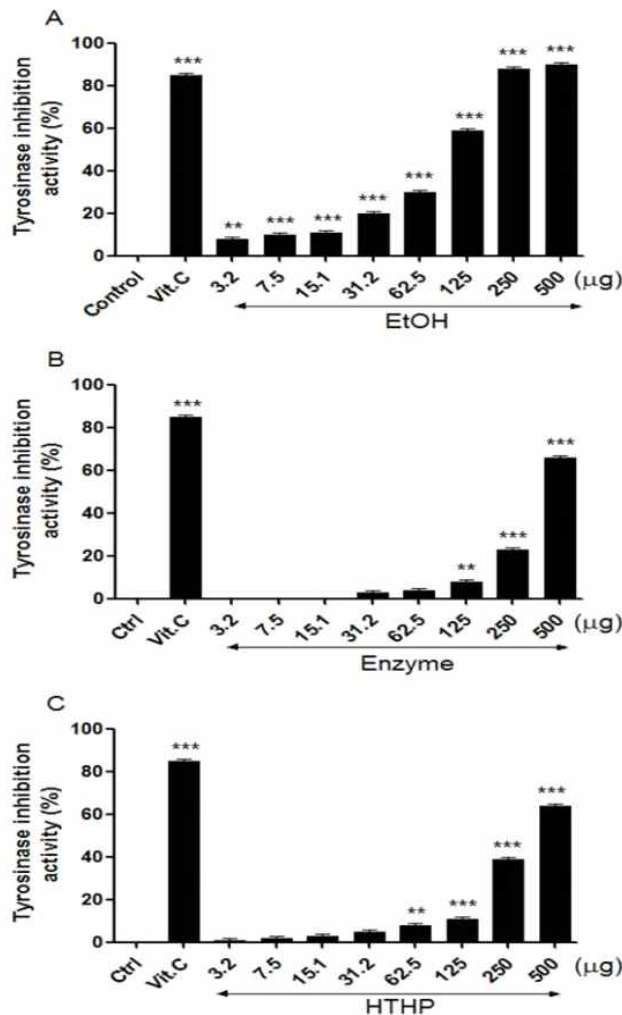


Fig 58. Tyrosinase inhibition by white rose extracts. A: EtOH, B: Enzyme, C: HTHP.

*Significantly different from control group ($P < 0.05, 0.01$ and 0.001).

마. 아토피개선: 비만세포 탈과립 억제시험(mast cell degranulation assay)

- (1) 시험물질의 과민반응 억제효과가 비만세포의 탈과립을 차단하는 작용에 의한 것인지를 규명하기 위해 RBL-2H3 cells로부터의 β -hexosaminidase 유리에 대한 억제효능을 평가함. β -Hexosaminidase는 히스타민, 세로토닌 등과 함께 비만세포의 탈과립 과정에서 분비되는 화학매개인자로서 β -hexosaminidase의 유리는 비만세포 과립 내 주요한 염증매개인자인 히스타민의 유리와 상관성이 높기 때문에 비만세포의 탈과립 지표로서 널리 이용되고 있음.
- (2) RBL-2H3 cells을 24 well plate에 1.5×10^6 cells/mL로 분주하여 37°C에서 12시간 배양한 후 배지를 제거한 well에 500 μ l의 extracellular hepes buffer를 넣고 각각의 시험물질을 농도별로 처리함.
- (3) 비교물질로는 면역억제제인 cyclosporine A를 0.5 μ g/mL 농도로 처리하고, 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 비만세포 탈과립 유도를 위해 50 nM phorbol 12-myristate 13-acetate와 200 nM ionomycin를 처리함. 37 °C에서 6시간 동안 추가배양한 후 상층액(50 μ l)을 취해 200 μ l의 p-nitrophenyl N-acetyl beta-D-glucosamine (1 mM in 0.05 M citrate buffer, pH 4.5)를 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 200 μ l의 sodium carbonate buffer (0.05 M, pH 10.0)를 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정함.
- (4) 세 가지 시험물질(EtOH, enzyme, HTHP) 중 항산화 작용, tyrosinase 저해 효과, NO 소거능 등에서 다른 물질들에 비해 상대적으로 높은 효과를 보인 EtOH 추출물을 대상으로 비만세포 탈과립 억제능을 확인한 결과 100 μ g/mL 이상의 농도에서 면역억제제인 cyclosporine A과 유사한 수준의 탈과립 억제를 보임(Fig. 59). 따라서 비만세포에 의한 염증작용으로 야기되는 과민성 피부 트러블에 대한 백장미 EtOH 추출물의 유의한 수준의 진정효과를 얻기 위해서는 100 μ g/mL 이상의 농도를 처리해야 할 것으로 판단됨.

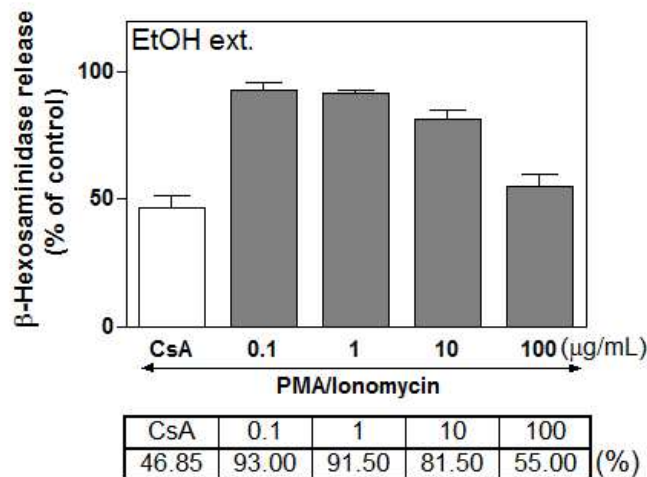


Fig 59. β -Hexosaminidase degranulation inhibition by white rose EtOH extract.

3. *in vivo* 주름개선 효능평가(Hairless mouse 주름개선 효능 확인)

가. 식약처 가이드라인 “미용관련 기능성시험” 및 국내외에 알려진 주름 감소 효과의 측정법 및 biomarker를 참고하여 백장미 추출물이 피부의 광노화에 의해 야기되는 피부 주름에 대해 효능이 있는지를 평가하는 데에 그 목적이 있음. 따라서 인위적으로 자외선을 조사하여 피부 주름을 유발시킨 hairless 마우스에 백장미 추출물을 투여하여 주름개선 효과를 제시하고자 함

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질

(가) 1차 년도에서 추출방식을 다르게 한 3종의 백장미 추출물[EtOH 추출, Enzyme 추출 및 고온가압(HTHP) 추출]에 대한 *in vitro* 주름개선을 평가한 결과, 세포내 콜라겐 생성 및 collagenase 억제시험에서 백장미 EtOH 추출물의 효능이 확인되었으며, elastase 활성 억제시험에서 EtOH > Enzyme > HTHP 순으로 우수한 것을 확인함. 이에 *in vivo* 시험에서는 EtOH 추출물에 대한 주름개선 효능을 평가하고자 하였으며, 수율 및 비용에서 탁월한 백장미 열수(Hot Water; HW) 추출물을 추가하여 비교 평가도 진행함.

(2) 실험동물

(가) 오리엔트바이오(가평, 한국)로부터 6주령 hairless 마우스(Skh-1)를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 마우스용 케이지에 3마리씩 수용. 동물실험실의 환경은 온도 23±2 °C, 상대습도 55±10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Halran #2018을 대한바이올링크(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(3) UV 조사

(가) 정상군을 제외한 모든 실험군의 동물은 10주간 동안 주 3회, 동일 시간에 UVB를 조사. UV조사는 UVB램프(WDU650, 월드코포레이션, 한국)를 이용하였으며, 첫 번째 주는 1MED씩, 2번째 주는 2MED씩, 3번째 주는 3MED씩, 4번째 주는 4MED씩 조사. 5주째부터는 4MED 씩 10주째까지 조사함.

(4) 1MED 설정

(가) MED는 홍반을 일으킬 수 있는 최소한의 UV 조사량을 말하며, 자외선 조사의 효과를 임상적으로 판단하는 실제적이고 가장 유용한 근거로 사용되고 있음. 1 MED를 설정하기 위하여 hairless 마우스를 마취한 후 지름 1cm의 구멍이 있는 천으로 마우스 등 표면을 덮고 15, 30, 60, 80, 100, 150 mJ까지 6개 부분을 조사하였으며, 24시

간이 경과 후 조사부위에 홍반의 발생여부를 육안으로 확인함. 그 결과, 조사량 중에서 홍반을 처음으로 나타나게 하는 조사량을 1 MED로 설정함.

(5) 시험물질 투여

(가) 시험물질은 정상군(normal), 주름유발군, 백장미 EtOH 추출물 저농도·고농도군, 백장미 HW 추출물 저농도·고농도등 6개군으로 나누어 실험을 실시(Table 14). 백장미 추출물군은 멸균 정제수에 각 용량에 따라 녹인 후 체중 kg당 10 mL씩 마우스용 존대를 이용하여 경구반복 투여하였으며, 정상군과 유발군은 멸균 정제수만을 투여함. 투여기간은 자외선 조사 전 4주와 조사 후 10주까지 하루 1회씩 14주간 시행함.

Table 14. Test groups for evaluation wrinkle formation in the hairless mice.

시험군	용량
1. Normal	vehicle
2. 유발군(UVB)	vehicle
3. WRPE-EtOH-저농도(EtOH60)	60 mg/kg
4. WRPE-EtOH-고농도(EtOH300)	300 mg/kg
5. WRPE-HW-저농도(HW60)	60 mg/kg
6. WRPE-HW-고농도(HW300)	300 mg/kg
6군	

(6) 임상 증상 관찰 및 체중 측정

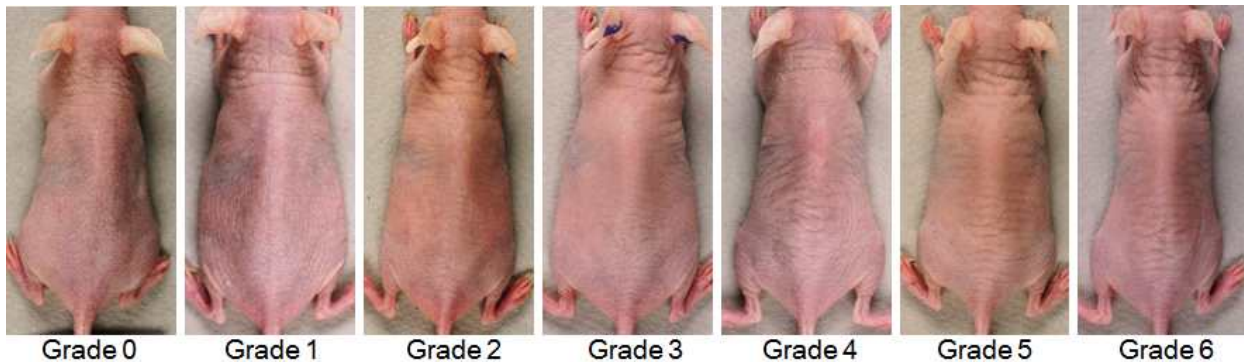
(가) 적응기간 및 시험기간 동안 1일 1회 임상 증상의 변화 및 사망여부를 관찰. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 시험 시작 전, 시험기간 중 매주 2회씩 실시함.

(7) 피부주름 측정

(가) 육안적 피부주름을 측정하기 위해 6, 8, 10주째에 마우스의 등쪽을 디지털 카메라를 이용해 근접 촬영하고, 피부주름 판정기준(Table 18)에 근거하여 주름을 평가. 또한, 주름의 정도를 측정하기 위해 UV조사 6, 8, 10주째에 실리콘폴리머(CharmFlex® impression material, 한국)를 이용하여 replica를 채취함. 채취한 replica는 빛의 입사각을 20도로 고정하여 주름의 명암 영상을 카메라로 촬영하여 이미지를 파일화하고, image analyzing program(Skin visiometer SV600 software, CK electronic Co., Germany)을 이용하여 Roughness의 값을 측정하여 군별 주름정도를 평가함. Roughness의 값은 가장 높은 봉우리의 값과 가장 낮은 골의 값의 차이를 나타내는 R1, 동일한 길이로 나눈 5조각의 R1값 중 가장 높은 값을 나타내는 R2, 동일한 길이로 나눈 5조각의 R1값들의 산술적인 평균값을 나타내는 R3, reference profile 위로 최고 mountain까지 선을 그어 중앙값으로 분리 했을 때 윗부분의 면적을 나타내는 R4, R4에 대한 산술평균값을 나타내는 R5로 측정함.

Table 15. Macroscopic wrinkling scores of UVB-induced wrinkle formation in hairless mice.

Score	Point of observations
0	수많은 세로방향 (head-to-tail direction)의 미세주름이 등 부위와 몸통 측면의 전반에 걸쳐 형성
1	등 부위의 세로방향의 미세주름이 약간 소실되어 매끈함
2	등 부위와 몸통 측면의 세로방향의 미세주름이 많이 소실되어 매끈하고, 길이가 짧고 얇은 사선방향의 주름이 등 부위 또는 몸통 측면에 부분적으로 형성
3	길이가 길고 얇은 사선방향의 주름이 등 부위와 몸통측면에 부분적으로 형성
4	길이가 길고 얇은 사선방향의 주름이 등 부위와 몸통측면의 전반에 걸쳐 형성 길이가 짧고 얇은 가로방향 (perpendicular to head-to-tail direction)의 주름이 등 부위와 몸통측면에 부분적으로 형성
5	길이가 길고 얇은 가로방향의 주름이 등 부위와 몸통측면에 전반적으로 형성 길이가 짧고 깊은 가로방향의 주름이 등 부위와 몸통측면에 부분적으로 형성
6	길이가 길고 깊은 가로방향의 주름이 등 부위와 몸통측면의 전반에 걸쳐 형성



(8) 조직학적 검사

(가) 시험 종료 후, 등쪽 피부를 적출한 후 10 % 중성 formalin 용액으로 고정. 조직을 파라핀에 포매한 후 5 μ m의 조직절편을 만들고 hematoxylin-eosin으로 염색하여 피부조직의 조직학적 변화를 광학현미경으로 관찰. 또한 collagen 감별을 위한 Masson-trichrome 염색을 진행하여 군별 변화를 분석.

(9) 통계처리

(가) 모든 측정값은 평균 \pm 표준오차로 나타냄. 일원분산분석(one-way ANOVA)로 분석 후 유의성이 관찰되면 Turkey's test를 통하여 $P < 0.05$ 의 수준에서 군간의 유의성을 검정함.

다. 결과

(1) 1MED 설정

(가) Hairless 마우스에게 UV를 조사하기 전에, 이들 마우스에서 홍반을 일으킬 수 있는 최소한의 농도인 1 MED를 결정하고자 15~150 mJ/cm²까지 6가지 조사량을 설정하여 UV조사량에 따른 홍반발생 정도를 관찰함. 그 결과, 최초로 홍반이 발생하기 시작하는 UV조사량은 약 30 mJ/cm²인 것으로 관찰됨. 따라서 결정된 1 MED의 양으로 마우스에 조사를 시작하여 매주 1 MED씩 증가시키면서 피부노화를 유발함.

(2) 임상증상 관찰 및 체중 변화

(가) 정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험기간 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았음. 투여 전 각 동물은 고른 체중범위를 나타냈으며, 시험물질 투여기간 중 정상군을 포함한 모든 시험군에서 유의한 체중 변화는 나타내지 않음(Fig. 60).

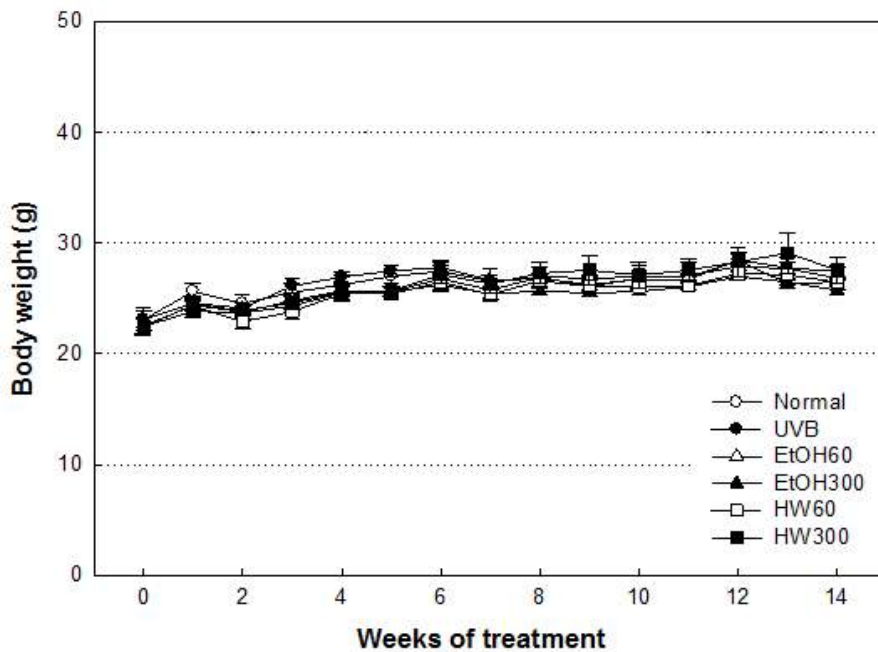


Fig 60. Body weight changes in hairless mice orally treated with test materials. Mean±S.E.

(3) 피부주름 평가

(가) UV 조사에 따른 주름 유발에 대해 육안으로 관찰시 정상군에 비해 유발군(UVB)의 피부주름 증가가 뚜렷하였으며(Fig. 61), 백장미 EtOH 추출물 고농도군(EtOH300)에서 유발군에 비해 주름 증가가 현저히 억제된 것이 관찰되었고, 주름평가에서도 유의적으로 주름 정도가 약한 것으로 확인됨(Fig. 62). 주름의 정도를 비교하기 위하여 6주, 8주, 10주에 등쪽피부 중앙부분에서 채취한 replica를 분석한 결과, UV를 조사한 모든 군에서 정상군에 비해 주름이 증가가 뚜렷함. 그러나 유발군(UVB)의

경우 중앙부분보다는 측면의 주름 정도가 더욱 심하게 나타났었던(Fig. 61) 관계로 replica 분석결과와 육안관찰결과가 상이하게 나타났으며(Fig. 62) 백장미 추출물 투여 군에서도 EtOH 추출물 고농도군의 개선효과는 관찰되지 않았음. 이러한 결과는 replica를 촬영한 이미지를 image analyzer로 분석 평가한 결과에서도 육안관찰에서 주름정도가 약한 것으로 확인된 EtOH 고농도 군과 HW 저농도 군이 R1에서 R5까지의 값이 유발군보다 유의적으로 높은 값을 나타내어(Fig. 64.) 주름의 정도가 더욱 심한 것으로 나타남.



Fig 61. UVB-induced wrinkle formation by white rose extract at the end of week 10.

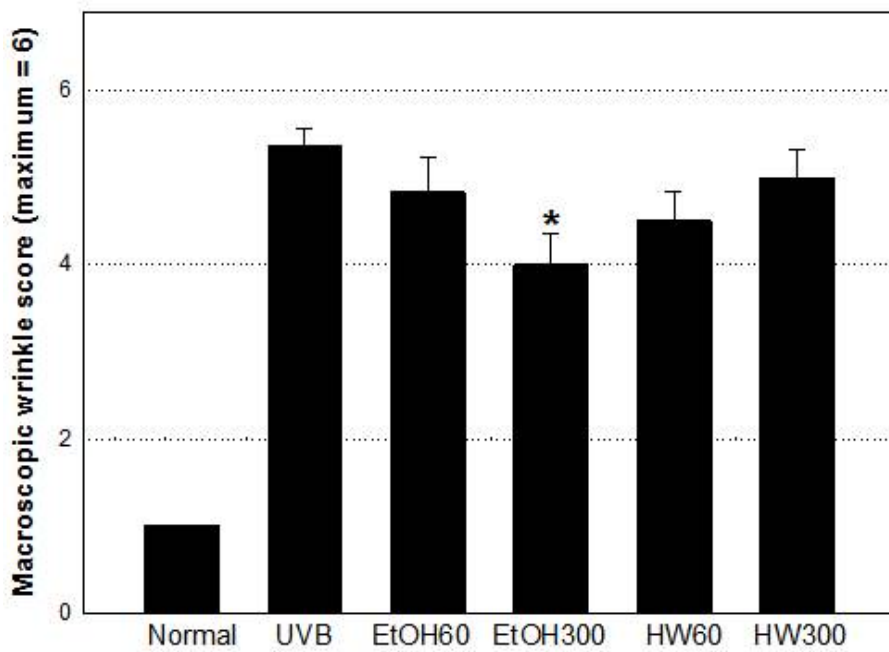


Fig 62. Wrinkle score of macroscopic observation by white rose extract at the end of week 10. Mean±S.E. *Significantly different from normal group ($P<0.05$).

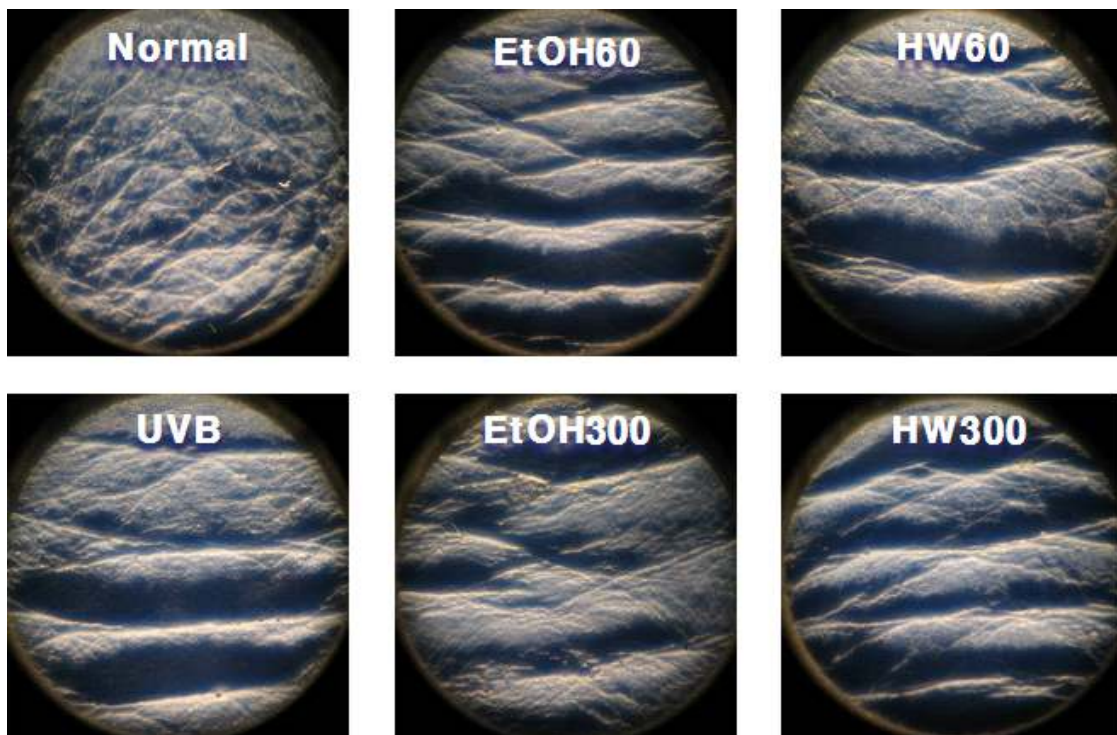


Fig 63. Skin impression of UVB-induced wrinkle formation by white rose extract at the end of week 10.

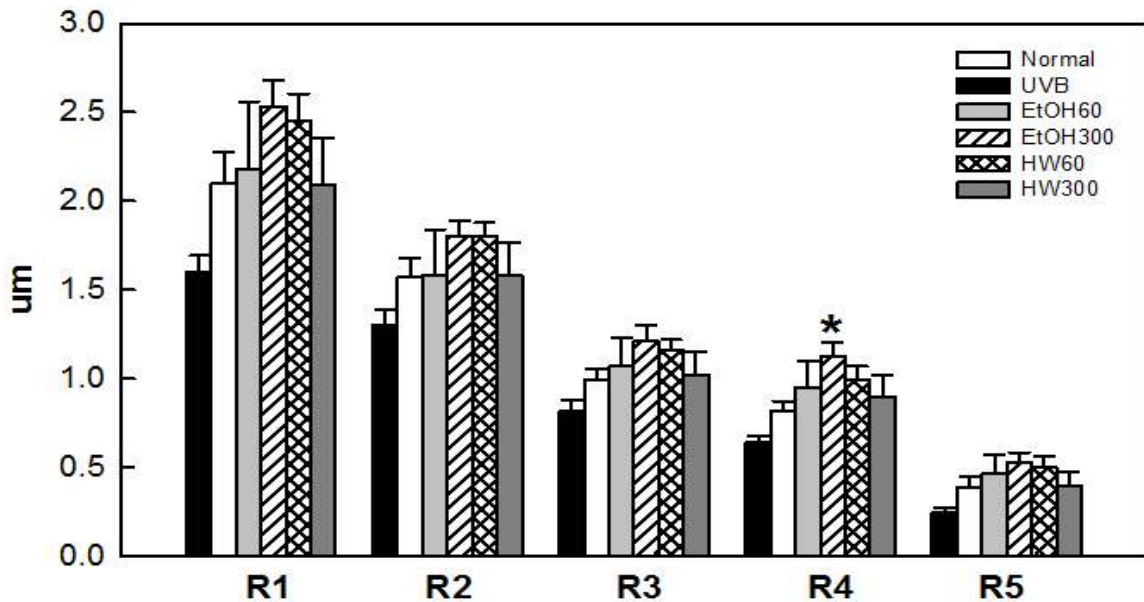


Fig 64. Evaluation of microrelief of wrinkle formation skin in hairless mice. Mean±S.E.
 *Significantly different from normal group (P<0.05).

(4) 피부조직의 병리학적 평가

(가) 피부 조직에 대한 H&E stain 결과에서는 UVB 유발군의 표피 두께가 정상군에 비해 3배 이상 증가되었으며(Fig. 65), 각질세포의 다형성 및 깊은 주름을 형성하고 모양의 크기도 현저히 증가된 것으로 관찰됨(Fig. 68). 백장미 추출물 투여군에서도 표피의 두께가 증가되었는데, 육안 주름평가에서는 주름의 정도가 낮게 나타나고 replica 주름평가에서는 주름의 정도가 깊게 나타난 EtOH 고농도군과 HW 저농도군의 표피 두께가 유발군에 비해 다소 얇아져 있는 것으로 나타남(Fig. 65). 또한 EtOH 고농도군과 HW 저농도군의 lipid pore의 수가 감소되었음이 관찰됨(Fig. 66). 그러나 주름의 깊이에 대해서는 군간의 차이가 나타나지 않음(Fig. 67). Masson trichrome stain을 통해 진피층 내 collagen의 양과 형태를 관찰한 결과에서는, 정상군은 collagen의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적인 반면 UVB 유발군은 collagen이 파괴되어 밀도가 엉성하고 배열이 불규칙하고 양도 많이 줄어 있었음. 이에 반해 백장미 추출물 투여군에서는 EtOH저·고농도 및 HW 저농도군에서는 유발군에 비해 collagen의 양이 다소 증가된 것으로 나타남(Fig. 68).

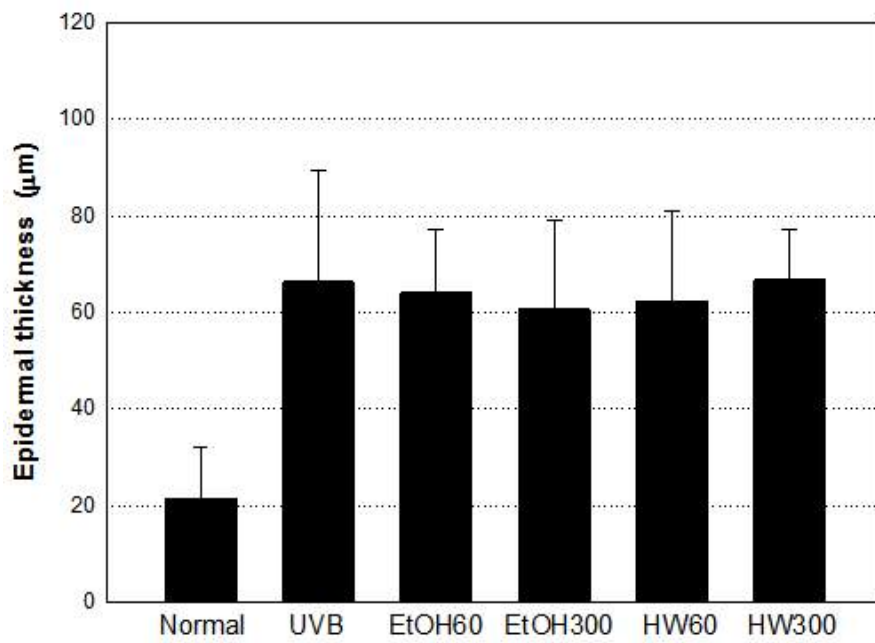


Fig 65. Effects of UVB irradiation on the epidermal thickness. Mean±S.E.

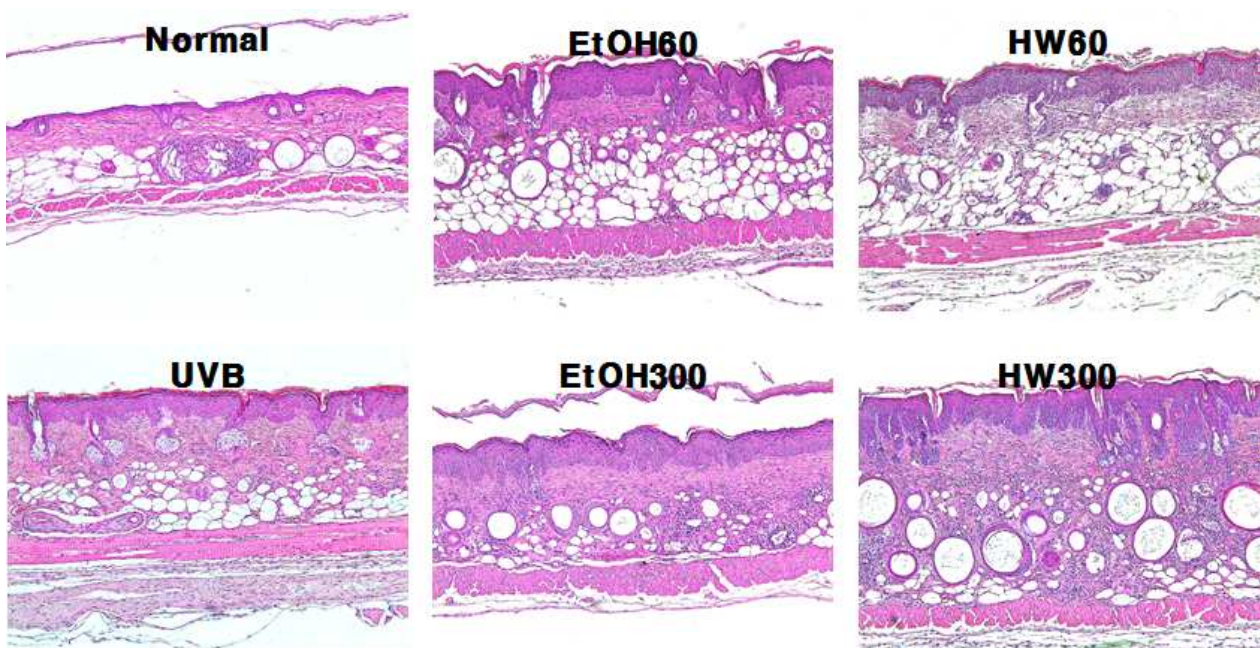


Fig 66. Histological observation of SKH-1 hairless mouse by white rose extract. H&E stain, X100.

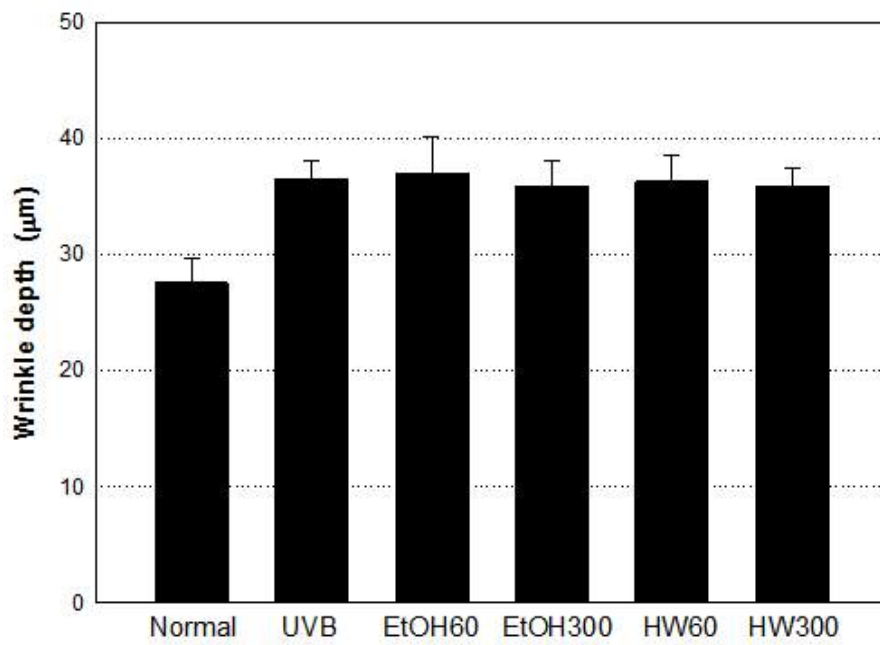


Fig 67. UVB-induced wrinkle depth by white rose extract in SKH-1 hairless mouse. Mean±S.E.

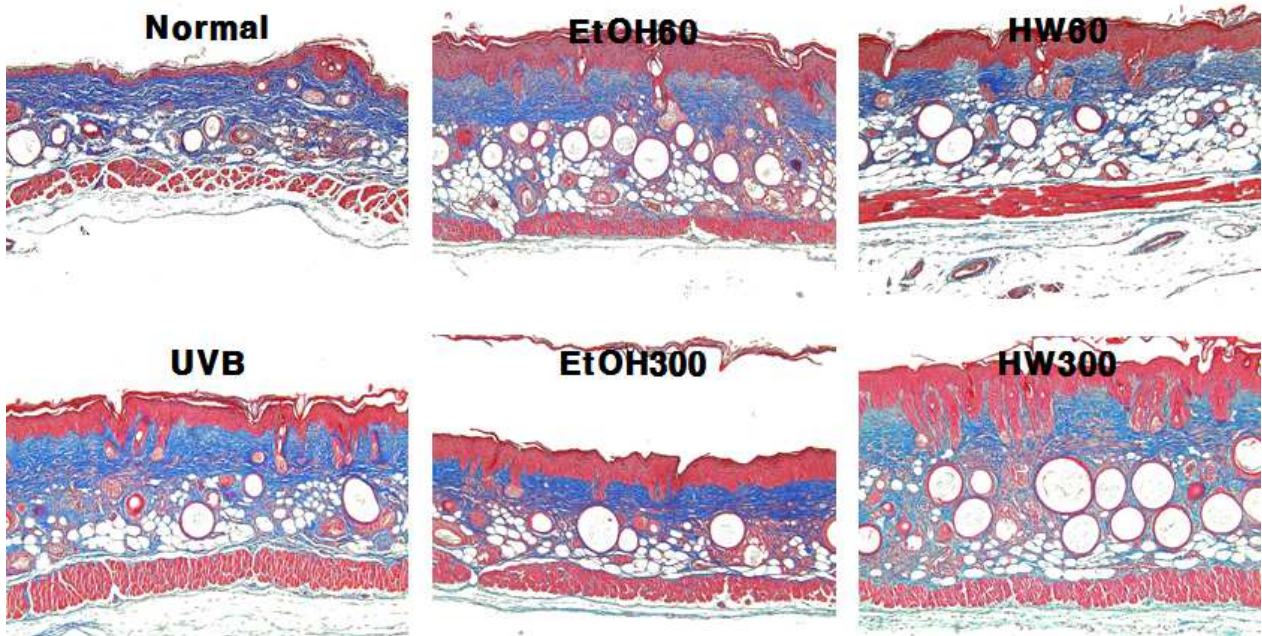


Fig 68. Histological observation of SKH-1 hairless mouse by white rose extract. Masson trichrome stain, X100.

(5) 추가실험

- (가) 본 연구팀은 추가적으로 피부 조직에 대해 피부 탄력을 유지하는 collagen 분해에 관여하는 대표적인 효소이며 UV 조사 등에 의해 증가되는 것으로 알려진 MMP-1 단백질과 피부 탄력을 관장하는 elastin을 추가적으로 분석하고 ELISA를 통해 collagen을 정량화하여 상기의 결과를 효과적으로 판정할 수 있도록 하고자 하였음.
- (나) elastin 분석: 시험 종료 후, 등쪽 피부를 적출한 후 10 % 중성 formalin 용액으로 고정. 조직절편을 만들어 탄력섬유(elastic fiber)의 양과 형태를 분석하기 위한 Verhoeff 염색을 진행하여 군별 변화를 분석.
- (다) MMP-1 real time PCR: 피부조직에서 Trizol법(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였으며 total RNA가 5 μ g이 되게 정량을 한 뒤 wizscript RTmaster (Wizbiosolutions, Korea)를 이용하여 revers transcription을 실시함. Real-time PCR은 SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 주형으로 마우스 등 피부조직의 cDNA를 사용하며 20 μ l를 합성. 반응은 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 이용하며 제조사의 지시에 따라 시행. 유전자에 특이적인 primer는 TIB Mol-Bio Synthesis (Berlin, Germany)에 의해 설계되고, 마우스 특이적인 유전자에 대한 primer를 이용. GAPDH primer는 내부표준인자로 사용함. 상대적인 Ct method를 이용하며, nine independent runs를 통해 분석함.
- (라) collagenase 단백질 정량: 피부 조직을 PBS에 넣고 2-8 $^{\circ}$ C 유지하면서 균질화 시킨 뒤 2000~3000 rpm에서 20분 centrifuge해서 얻은 상등액을 사용. Mouse Collagenase I ELISA Kit (abbexa)를 사용하여 흡광도 450 nm에서 collagenase 1 standard와 비교하여 분석함.
- (마) Verhoeff stain을 통해 진피층 내 탄력섬유(elastic fiber)의 양과 형태를 관찰한 결과, 정상군에 비해 UVB 유발군에서는 변성되고 엉긴 탄력섬유가 증가된 것이 관찰됨. 이에 반해 백장미 추출물 투여군에서는 EtOH 고농도에서 변성된 탄력섬유의 양이 감소된 것으로 나타남(Fig. 69). 각 개체에 대해 random으로 선정한 3곳의 피부조직 슬라이드에서 길이(mm)당 변성된 탄력섬유의 수를 측정한 결과에서는 UVB 유발군의 변성된 탄력섬유가 정상군에 비해 유의적으로 증가된 것에 반해, 물질 투여군 모두 유발군에 비해 변성의 정도가 낮게 관찰되었으며 EtOH 고농도 및 HW 저·고농도군에서 유의적으로 감소된 것으로 나타남(Fig. 70). Masson trichrome stain에서는 UVB 유발군의 collagen 양이 준 것에 반해 백장미 추출물 투여군에서는 EtOH저·고농도 및 HW 저농도군에서는 유발군에 비해 collagen의 양이 다소 증가된 것으로 나타남(Fig. 69). 그러나 collagen 분해에 관여하는 collagenase 단백질 양 및 MMP-1 유전자의 발현억제효능을 분석한 결과에서는 collagenase 단백질 양에 대해 정상군과 UVB의 유발군의 차이가 크지 않았지만 EtOH 고농도 및 HW 저·고농도군이 정상군보다도 낮은 수치를 나타냄(Fig. 71). MMP-1 유전자 발현억제 정도를 비교한 결과에서도 EtOH 고농도 및 HW 저·고농도군이 정상군보다도 낮은 수치를 나타냄으로써 collagenase와 비슷한 경향을 보였

미.

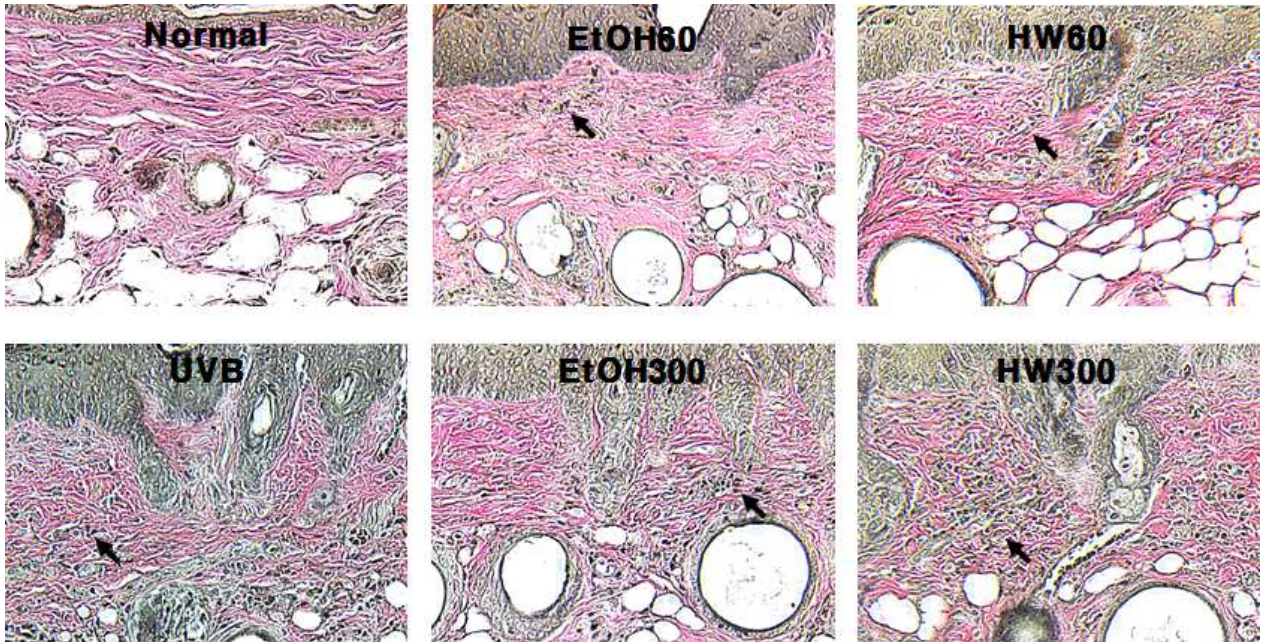


Fig 69. Histological observation of SKH-1 hairless mouse by white rose extract. Verhoeff stain, X100.

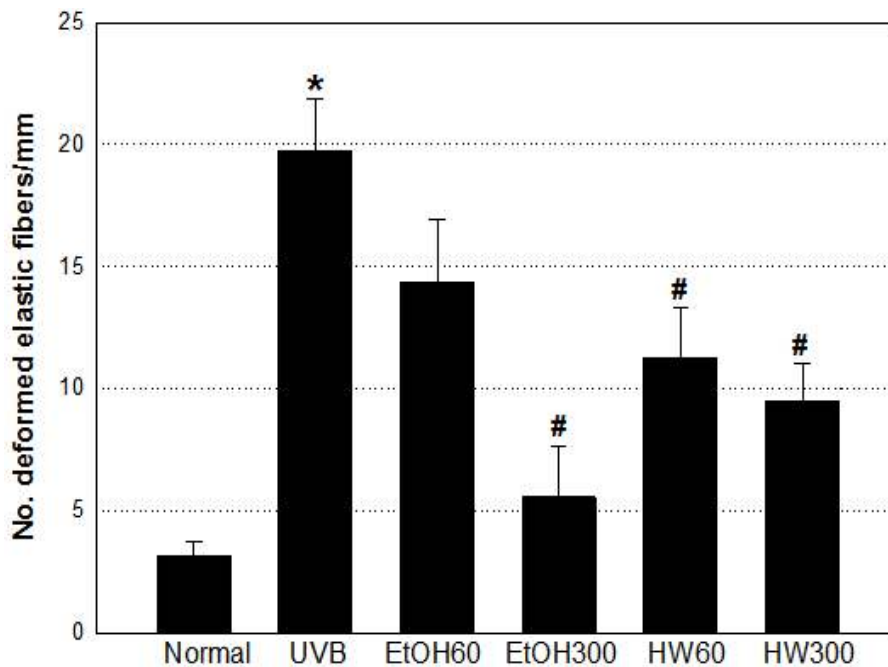


Fig 70. Comparison in deformed elastic fiber of SKH-1 hairless mouse by white rose extract. Mean±S.E.

*Significantly different from normal group ($P < 0.05$).

#Significantly different from UVB group (P<0.05)

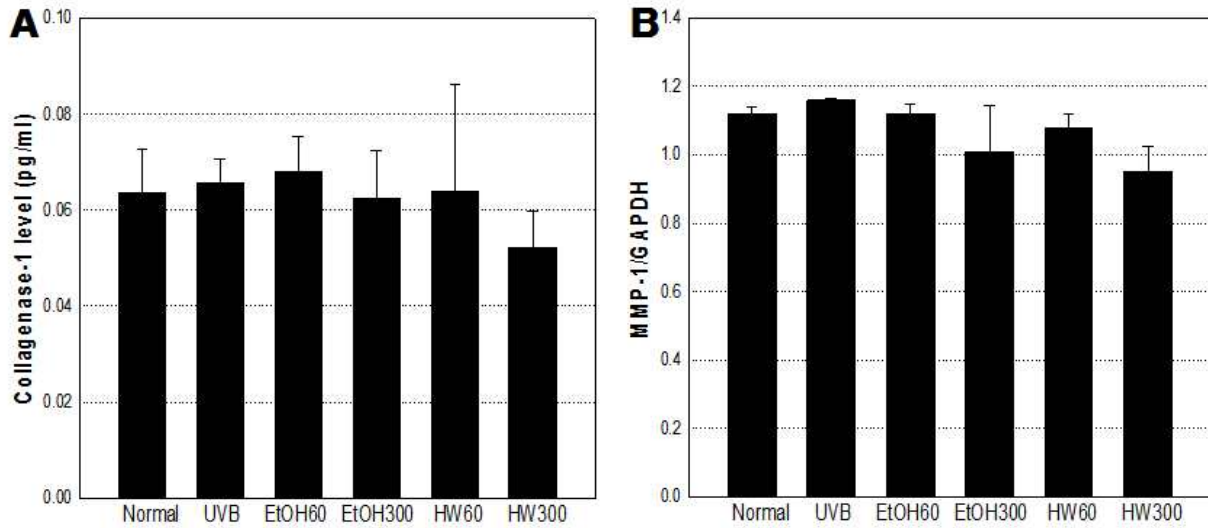


Fig 71. Comparison in collagenase-1 protein(A) activity and MMP-1 mRNA expression(B) of SKH-1 hairless mouse by white rose extract.

다. 고찰

(1) Hairless 마우스의 피부에 UVB를 조사하면 표피가 두꺼워지고 정상적인 collagen의 구조가 파괴되면서 배열이 무질서해지며 fibroelstosis가 발생하고 glycosaminoglycan이 증가하는 등 자외선에 손상 받은 인간의 피부와 거의 유사한 피부변화를 보임. 이에 본 연구에서는 인위적으로 자외선을 조사하여 피부 주름을 유발시킨 hairless 마우스에 백장미 추출물을 투여하여 주름개선 효과를 제시하고자 하였음. 시험은 정상군과 UVB 유발군, 백장미 EtOH 추출물 저(60 mg/kg)·고(300 mg/kg)농도군, 열수(HW) 추출물 저(60 mg/kg)·고(300 mg/kg)농도군을 두고, UV 조사 전 4주와 조사 후 10주까지 하루 1회씩 14주간 경구로 반복 투여하였으며, 주름을 유발하기 위하여 주 3회 10주간 시행함. 그 결과 UVB 유발군에서는 주름증가가 현저하게 관찰된 반면 EtOH 고농도군과 HW 저농도군에서는 주름증가가 감소된 것으로 나타남. 그러나 이러한 결과는 replica의 image analyzer 분석평가에서는 반대되는 양상으로 관찰됨. 유발군의 주름정도가 정상군에 비해 유의적이지 않았으며, 오히려 EtOH 고농도군과 HW 저농도군에서 주름 정도가 심한 것으로 나타남. 이 결과는 육안관찰평가는 등쪽 전체의 주름에 대해 평가하는 반면, replica를 채취하는 부위는 등쪽 중앙부분에 한정된 것에 의한 것으로 유발군의 경우 등쪽 중앙부위보다 측면부위에 주름이 더 많이 유발되어 있고, 중앙부위의 피부가 매우 두터워진 것에 의한 것이라 생각되어 짐. 피부조직의 병리학적 검사결과 유발군의 표피층에 비해 EtOH 고농도군과 HW 저농도군의 표피층 두께가 다소 얇아져 있었던 점과 collagen이 증가된 점, 변성된 탄력섬유의 양에 대해 EtOH 고농도 및 HW 저·고농도군

에서 유의적으로 감소된 것, 피부 조직에 대한 collagenase 및 MMP-1 분석 결과 EtOH 고농도 및 HW 저·고농도군이 정상군보다도 낮은 수치를 나타낸 점들을 종합하면, **백장미 추출물은 collagen의 증가보다는 elastase를 효과적으로 억제함으로써 주름개선에 효과를 주는 것으로 사료되며, 그 효과는 EtOH 고농도 > HW 고농도 > HW 저농도 > EtOH 저농도 순으로 우수한 것으로 나타남.**

4. 보습 효능평가(세포내 및 동물 피부내 ceramide 유지효능 확인)

가. *in vitro* 보습 효능평가(세포내 ceramide 유지효능 평가)

(1) 평가방법

(가) 표피의 수분 증발이 ceramide 및 자연보습인자의 함량 변화와 역의 상관관계가 있음이 여러 연구 결과에서 보고되고 있어, 표피세포 keratinocyte 및 fibroblast 중 주요피부세포인 keratinocyte에 대해 creamide 유지효능을 확인함으로써 보습효능 평가하고자 함

(2) 재료 및 방법

(가) 피부 각질형성세포(Keratinocyte) 배양

① 실험에 사용한 Primary Normal Human Epidermal Keratinocyte (NHEK, ATCC® PCS-200-011) cell line은 ATCC로부터 분양받아 사용함. 분양받은 세포주는 ATCC (Masaasa, VA, USA)에서 공급받은 keratinocyte용 배지에 0.4 % bovine pituitary extract (BPE), 0.5 ng/ml rh TGF- α , 6 mM L-glutamine, 100 ng/ml hydrocortisone hemisuccinate, 5 mg/ml rh insulin, 1.0 mM epinephrine, 5 mg/ml apo-transferrin을 첨가하여 37 °C, 5 % CO₂ 조건 하에서 배양하여 사용함. 세포를 6 well plate에 1x10⁴개로 분주하고 약 80 %의 confluency에 도달할 때까지 배양.

(나) 산화반응 유도 및 ceramide 분석

① 배양된 세포에 시료를 처리하기 전에 배지를 제거한 후 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거한 다음 BPE를 첨가하지 않은 keratinocyte 배지에 백장미 EtOH 추출물과 HW 추출물을 각각 50, 500 μ g/mL의 농도로 처리하여 CO₂ 배양기에서 30분간 배양. 대조군은 상기와 동일한 배지에서 시험물질을 첨가하지 않은 상태로 배양한 것을 이용. 백장미 추출물에 30분간 배양된 세포에 산화반응을 유도하기 위해 10 mM H₂O₂를 함유한 배지를 처리하여 30분 동안 배양한 후, ceramide 유지 효능을 확인하기 위해 ceramide 생합성을 조절하는 주요 단계의 효소인 스핑고지질 SPTLC2 유전자 발현을 측정함. 수확한 세포에서 Trizol법(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였으며 total RNA가 5 μ g이 되게 정량을 한 뒤 wizscript RTmaster (Wizbiosolutions, Korea)를 이용하여 revers transcription을 실시함. 반응은 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 이용하며 제조사의 지시에 따라 시행. 유전

자에 특이적인 primer는 TIB Mol-Bio Synthesis (Berlin, Germany)에 의해 설계되고, human 특이적인 유전자에 대한 primer를 이용. β -actin primer는 내부표준인자로 사용함. 상대적인 Ct method를 이용하며, nine independent runs를 통해 분석함.

(3) 결과 및 고찰

(가) 주요피부세포인 keratinocyte (NHEK)에 대해 creamide 유지효능을 평가하기 위해 ceramide 생합성을 조절하는 주요 단계의 효소인 스핑고지질 SPTLC2 유전자 발현을 측정된 결과, 정상 세포에 비해 H_2O_2 로 산화반응을 유도한 세포의 발현양이 감소된 것으로 나타났으며 백장미 추출물을 처리한 군 모두 H_2O_2 유도군보다도 낮은 수치를 나타냄으로써 유의적인 결과가 확인되지 않음. 이러한 결과는 백장미 추출물의 첨가 전 2단계 filter (0.8 및 0.4 μm)처리 과정에서도 제거되지 않은 particle이 세포의 성장을 저해시킨 점이 영향을 미쳤을 것이라 생각됨. 이에 따라 백장미 추출물의 보습 효능을 평가하기 위해서는 *in vitro* 보다는 *in vivo* 가 적절할 것으로 사료됨.

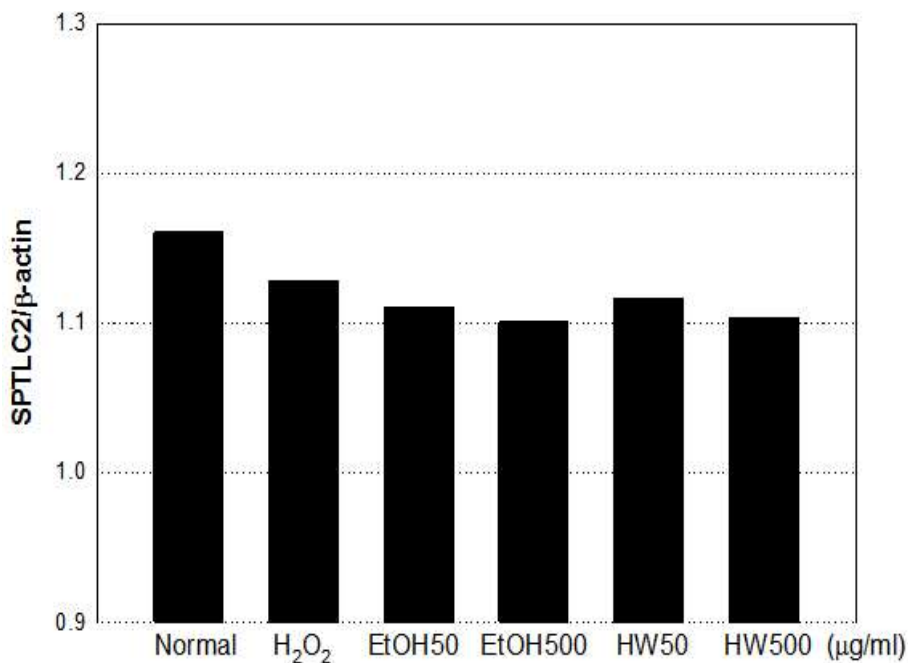


Fig 72. Comparison in SPTLC2 mRNA expression of NHEK cell by white rose extract.

나. *in vivo* 보습 효능평가(동물 피부내 ceramide 유지효능 평가)

(1) 재료 및 방법

(가) 실험동물

- ① 오리엔트바이오(가평, 한국)로부터 6주령 hairless 마우스(Skh-1)를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 마우스용 케이지에 3마리씩 수용함. 동물실험실의 환경은 온도 23 ± 2 $^{\circ}C$, 상대습도 55 ± 10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Halran #2018을 대

한바이오링크(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(나) UV 조사

- ① 표피장벽의 붕괴와 더불어 ceramide 함량을 감소시키기 위해 정상군을 제외한 모든 실험군의 동물은 시험물질 투여 4주 후, 회당 30 mJ/cm²의 UVB를 격일간격으로 총 5회(10일간)를 실시하여 최종조사량 150 mJ/cm²가 되도록 UVB램프를 이용하여 UV를 조사함.

(다) 시험물질 투여

- ① 시험물질은 정상군(normal), 주름유발군, 백장미 EtOH 추출물 저농도·고농도군, 백장미 HW 추출물 저농도·고농도등 6개 군으로 나누어 실험을 실시(Table 16). 백장미 추출물군은 멸균 정제수에 각 용량에 따라 녹인 후 체중 kg당 10mL씩 마우스용 존대를 이용하여 경구반복 투여하였으며, 정상군과 유발군은 멸균 정제수만을 투여함. 투여기간은 UV 조사 전 4주와 조사 후 4주까지 하루 1회씩 총 8주간 시행함.

Table 16. Test groups for evaluation moisture-retaining ability in the hairless mice.

시험군	용 량
1. Normal	vehicle
2. 유발군 (UVB)	vehicle
3. WRPE-EtOH-저농도 (EtOH60)	60 mg/kg
4. WRPE-EtOH-고농도 (EtOH300)	300 mg/kg
5. WRPE-HW-저농도 (HW60)	60 mg/kg
6. WRPE-HW-고농도 (HW300)	300 mg/kg
6군	

(라) 임상 증상 관찰 및 체중 측정

- ① 적응기간 및 시험기간 동안 1일 1회 임상 증상의 변화 및 사망여부를 관찰. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 시험 시작 전, 시험기간 중 매주 2회씩 실시함.

(마) 수분 손실량(Transepidermal water loss, TEWL) 측정

- ① 피부 표면의 보습 상태를 측정하기 위해 투여 종료 다음날에 VapoMeter SWL 4102 (Delfin Technologies Ltd., Kuopio, Finland)를 이용하여 30분 간격으로 2회 측정된 뒤 경표피 수분 손실량의 평균치를 비교 분석. 각 시험군의 hairless 마우스의 등 피부를 적출하고 면도기를 사용하여 털을 제거한

후, microbalance를 이용하여 표피의 무게를 측정하여 표피 수분 함량 분석.

(바) 피부조직내 ceramide 합성 효소(SPTLC2) 분석

- ① 표피 수분 손실량을 측정한 피부 조직은 분석 전까지 냉동상태로 보관함. 피부 조직은 Trizol법(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였으며 total RNA가 5 μ g이 되게 정량을 한 뒤 wizscript RTmaster (Wizbiosolutions, Korea)를 이용하여 revers transcription을 실시함. 반응은 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 이용하며 제조사의 지시에 따라 시행. 유전자에 특이적인 primer는 TIB Mol-Bio Synthesis (Berlin, Germany)에 의해 설계되고, 마우스 특이적인 유전자에 대한 primer를 이용. GAPDH primer는 내부표준인자로 사용함. 상대적인 Ct method를 이용하며, nine independent runs를 통해 분석함.

(사) 통계처리

- ① 모든 측정값은 평균 \pm 표준오차로 나타냄. 일원분산분석(one-way ANOVA)로 분석 후 유의성이 관찰되면 Turkey's test를 통하여 $P < 0.05$ 의 수준에서 군간의 유의성을 검정함.

(2) 결과

(가) 임상 증상 관찰 및 체중 측정

- ① 정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험기간 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았음. 투여 전 각 동물은 고른 체중범위를 나타냈으며, 시험물질 투여기간 중 정상군을 포함한 모든 시험군에서 유의한 체중 변화는 나타내지 않음(Fig. 73).

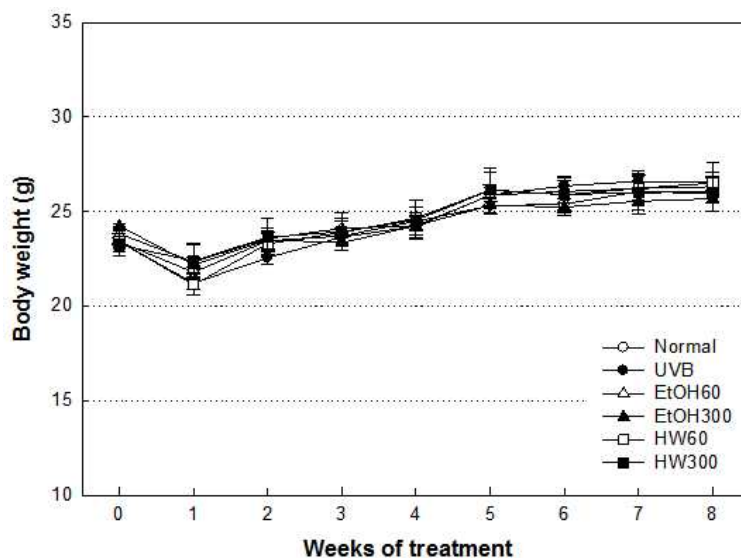


Fig 73. Body weight changes in hairless mice orally treated with test materials. Mean \pm S.E.

(나) 수분손실량(TEWL)의 변화

- ① 표피장벽의 붕괴와 더불어 ceramide 함량을 감소시키기 위해 4주간 UV 조사한 후 TEWL meter를 사용하여 피부 보습상태의 지표가 되는 수분손실량을 측정한 결과, 아무런 처리도 하지 않은 정상군의 TEWL 수치는 10.50 g/m²/hr인데 반해 UVB 유발군은 10.96 g/m²/hr으로 유의적인 차이를 나타내지 않음. 백장미 EtOH 추출물 저농도와 고농도군은 각각 9.98 과 8.70 g/m²/hr으로, 백장미 HW 추출물 저농도와 고농도군은 11.22와 11.01 g/m²/hr로 나타남으로써 EtOH 추출물이 HW 추출물보다 보습상태가 좋은 것으로 나타남(Fig. 74). EtOH 고농고군은 유발군에 비해 유의적으로 수분손실량이 낮아짐으로써 보습 효능이 있음이 확인됨.
- ② 표피 중량으로 비교한 표피의 수분함량에서는 정상군이 UVB 유발군에 비해 낮은 것으로 나타났으며, HW 저농도군은 이러한 정상군보다도 낮게 나타남. 다른 투여군에서는 유의적이 변화가 관찰되지 않음(Fig. 75).

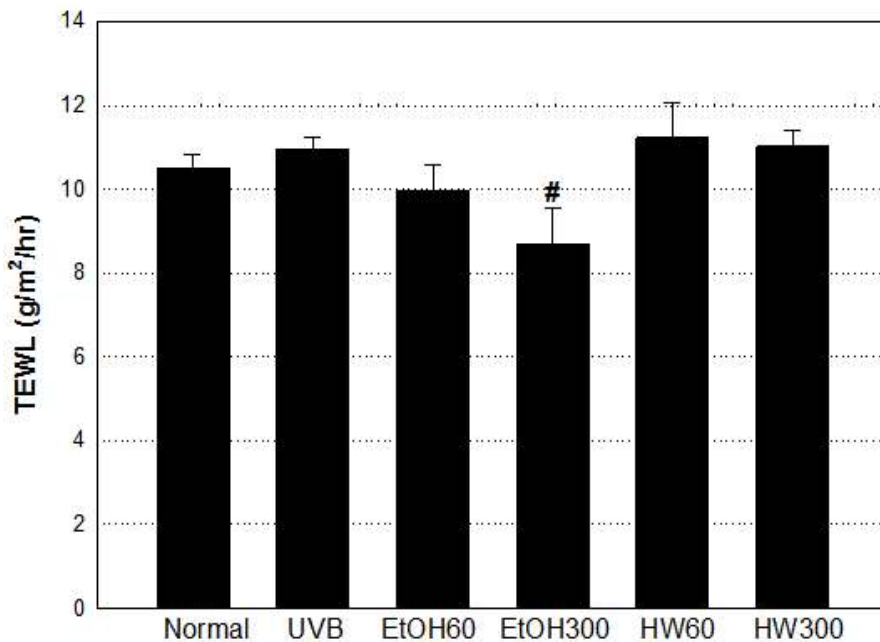


Fig 74. Comparison in transepidermal water loss(TEWL) of SKH-1 hairless mouse by white rose extract.

#Significantly different from UVB group (P<0.05).

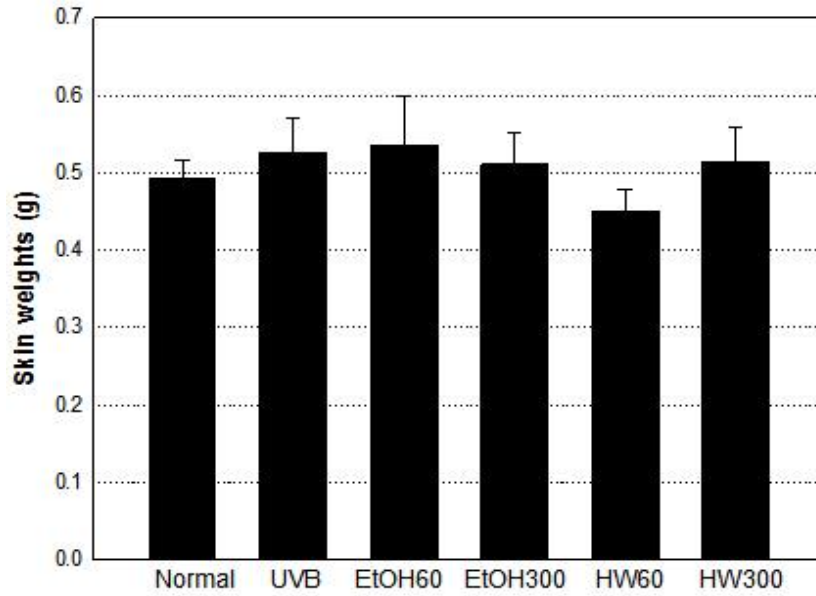


Fig 75. Comparison in skin weight of SKH-1 hairless mouse by white rose extract.
 *Significantly different from normal group ($P < 0.05$).

(다) ceramide 합성 효소(SPTLC2)의 변화

① 4주간의 UV 조사 후 적출한 피부조직에 대해 ceramide 생합성 효소인 스핑고지질 SPTLC2 유전자 발현을 측정 한 결과, 수분손실량에서의 결과와 마찬가지로 정상군과 UVB 유발군과의 차이가 크지 않음. 백장미 추출물 투여군에서는 EtOH 고농도군에서 약간 높은 발현량을 보였으며, HW 고농도군은 오히려 낮은 발현량이 확인됨(Fig. 76).

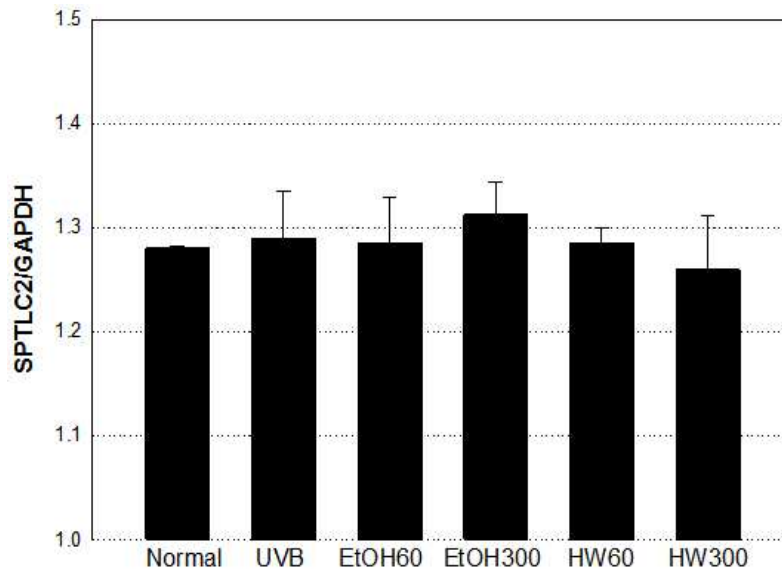


Fig 76. Comparison in SPTLC2 mRNA expression of SKH-1 hairless mouse by white rose extract.

(3) 고찰

(가) 표피장벽의 붕괴와 더불어 ceramide 함량을 감소시키기 위해 4주간 UV 조사시킨 후, 마지막 조사 다음날 수분손실량(TEWL)을 측정함. TEWL 수치는 피부로부터 발산되는 수분량으로서 이 수치가 높을수록 피부의 보습 기능이 떨어져 있음을 의미하며, 동시에 피부 고유의 장벽 기능이 손상되었음을 알 수 있음. TWEL 수치 측정 결과 정상군과 UVB 유발군에서 유의적이 차이가 나타나지 않았는데, 이는 동물 입수상의 문제로 뒤늦게 입수된 정상군의 등피부에 충분한 양의 vehicle이 도포되지 못한 것과 시간상의 이유로 단축되었던 4주간의 유발이 문제가 되었던 것으로 판단됨. 그럼에도 불구하고 EtOH 고농도 군에서는 유의적으로 TEWL 수치가 낮게 나타남으로써 보습 기능이 향상되는 있는 것이 확인됨. 또한 ceramide 생합성 효소인 SPTLC2 유전자 발현정도에서 작게나마 다른 군에 비해서는 발현량이 증가된 것으로 나타남으로써 **백장미 EtOH 추출물 고농도군에서 보습효과의 가능성을 확인함.**

5. 미백 효능평가

가. 평가방법

(1) 비인체 시험자료로서 효력을 입증할 수 있는 시험법 중 “피부의 미백에 도움을 주는 제품의 유효성평가 가이드라인”을 참고하여 백장미 추출물이 광노화에 의해 야기되는 색소침착에 대해 효능이 있는지를 평가하는 데에 그 목적이 있음. 따라서 미백효과를 측정하기 위해서 가장 많이 사용되고 있으며, UV에 의한 피부내 변화양상이 인체와 가장 유사한 모델인 brown guinea pig를 적용하여 백장미 추출물의 미백 효과를 제시하고 자 함.

나. Brown guinea pig(도포)에서의 미백 효능평가

(1) 미백효능을 평가함에 있어, Brown guinea pig 의 동물값 상승으로 인해 실험 진행에 어려움이 예상됨. 이에 본 연구팀은 Brown guinea pig의 투여방법을 경구에서 도포로 변경하여 진행하고, 경구 투여에 따른 효능평가는 DBA2 마우스를 이용한 미백효능 평가(도포 및 경구)로 대체함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시험물질

① 1차 년도에서 추출방식을 다르게 한 3종의 백장미 추출물[EtOH 추출, Enzyme 추출 및 고온가압(HTHP) 추출]에 대한 *in vitro* tyrosinase 활성 억제시험에서 백장미 EtOH 추출물의 효능이 가장 우수한 것을 확인함. 이에 *in vivo* 시험에서는 EtOH 추출물에 대한 미백 효능을 평가하고자 하였으며, 수율 및 비용에서 탁월한 백장미 열수(Hot Water; HW) 추출물을 추가하여 비교 평가도 진행함.

(나) 실험동물

- ① 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 8주령 brown guinea pig를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 guinea pig용 케이지에 3마리씩 수용함. 동물실험실의 환경은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 55 ± 10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. guinea pig용 전용사료를 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(다) 색소침착 유발

- ① 9주령에 기니피그의 등쪽 부위를 자외선 조사 하루 전 전기면도기로 제모한 후, 등 부위의 피부에 1.5 x 1.5 cm의 정사각형의 자외선 조사부위 6개의 창이 만들어진 알루미늄 호일을 접착시킨 후 UVB를 60 mJ/cm^2 를 조사, 4주간 하루 1회씩 실시하여 최종조사량 600 mJ/cm^2 가 되도록 하여 색소침착을 유발함.

(라) 시험물질의 도포

- ① 시험물질은 UVB 유발군(vehicle), 백장미 EtOH 추출물 저농도·고농도군, 백장미 HW 추출물 저농도·고농도등 5개군으로 나누어 도포함. 도포기간은 자외선 조사 전 4주와 조사 후 4주까지 하루 1회씩 8주간 시행함.

(마) 색소침착 확인

- ① 색소 침착 정도를 분석하기 위해 피부 표면 상태를 디지털 카메라를 이용해 촬영하고, 색소침착 정도에 따른 scoring (maximum 5)을 진행함.

(바) 조직학적 검사

- ① 시험 종료 후, 등쪽 피부를 적출한 후 10 % 중성 formalin 용액으로 고정. 조직을 파라핀에 포매한 후 5 μm 의 조직절편을 만들고 Fontana-Masson 염색을 진행하여 피부조직의 조직학적 변화 및 melanin 침착 정도를 분석.

(3) 결과

(가) 색소침착

- ① 4주간의 UV 조사로 색소침착이 유발된 것이 확인되었으며, 백장미 EtOH 추출물 저, 고농도군이 UVB 유발군에 비해 침착정도가 약한 것으로 나타남. HW 추출물 저, 고농도군은 유발군에 비해 색소침착 정도가 불규칙하고 드문드문 색소침착이 없는 부분이 관찰됨. 색소침착 정도를 0점, 색소침착 없음; 1점, 색소침착범위 30% 미만 및 색 열음; 2점, 색소침착 범위 30 ~ 50% 미만 및 색 열음; 3점, 색소침착 범위 50 ~ 80% 이상 및 색 조금 진함; 4점, 색소침착 범위 80% 이상 및 색 열음; 5

점, 색소침착 범위 80% 이상 및 색 진함으로 점수화함. 그 결과 UVB 유발군은 3.8 ± 0.37 점으로 높은 색소침착 정도를 나타냈으며, EtOH 추출물 저, 고농도군은 3.0 ± 0.00 점, 2.8 ± 0.2 점으로 HW 추출물 저, 고농도군은 3.2 ± 0.2 점, 3.6 ± 0.4 점으로 HW 추출물에 비해 EtOH 추출물군이 미백효능이 뛰어나며 EtOH 고농도군이 가장 탁월한 것으로 나타남(Fig. 77).

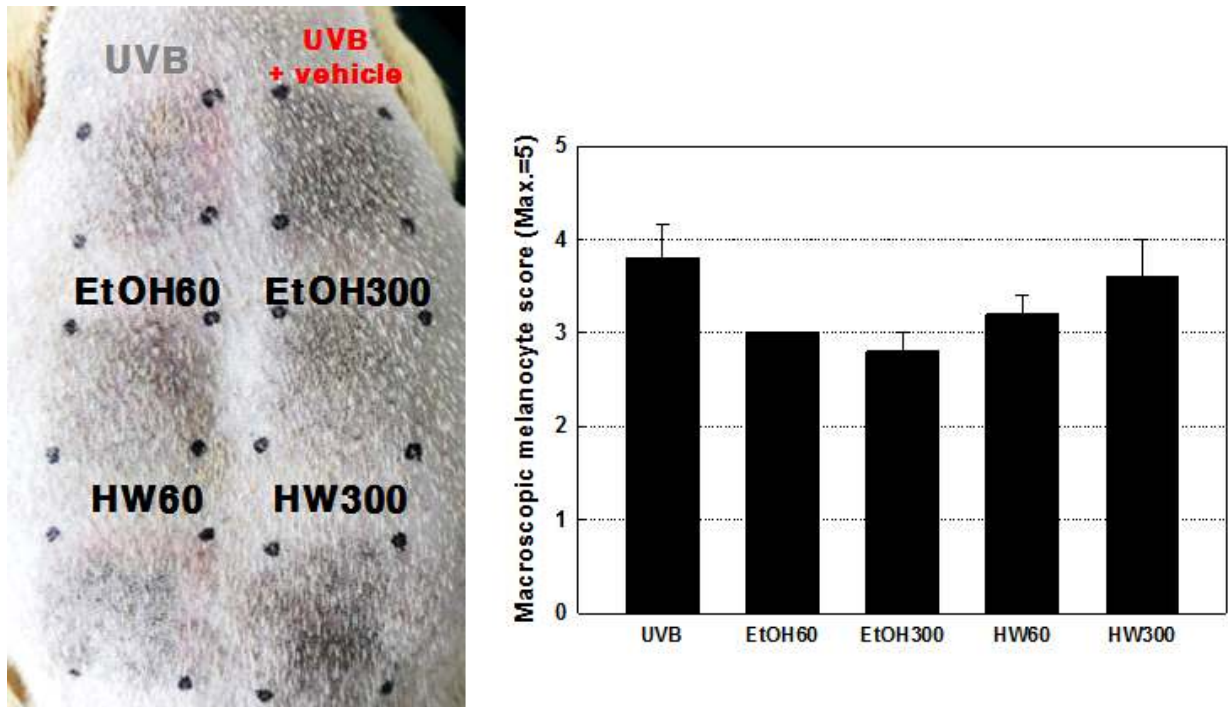


Fig 77. UVB-induced pigmentation by white rose extract on brown guinea pigs at the end of week 8. Mean±S.E.

(나) 피부조직의 병리학적 평가

① 피부 조직에 대한 Fontana-Masson stain을 통해 피부조직내의 melanin 색소 침착 정도를 분석한 결과, 정상군에 비해 UVB 유발군의 melanin이 증가된 것으로 나타남. 이에 반해 백장미 EtOH 추출물 고농도군과 HW 추출물 고농도군에서는 유발군에 비해 melanin 수가 적은 것으로 관찰됨(Fig. 78). 이러한 melanin의 수를 melanin content score 1점, melanin 5개 미만; 2점, melanin 5~10개; 3점, 100개 미만; 4점, 100개이상으로 하여 cm당으로 합산하여 분석함. 그 결과 UVB 유발군은 정상군에 비해 7.5배 증가된 것으로 나타났으며, 백장미 추출물군은 유발군의 melanin content에 비해 EtOH 저농도, 고농도군은 각각 0.10 %, 0.14 %, HW 저농도, 고농도군은 0.07 %, 0.0 8% 감소된 것으로 확인됨(Fig. 79).

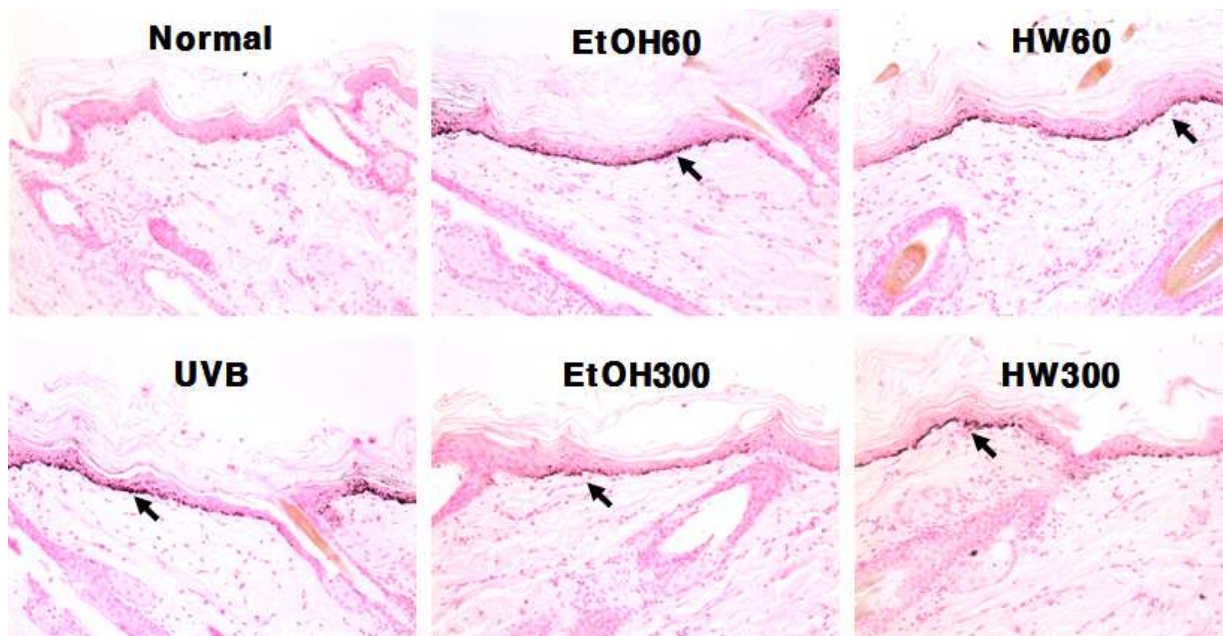


Fig 78. Histological examination of dorsal skins of brown guinea pigs exposed UVB. Fontana-Masson stain, X200.

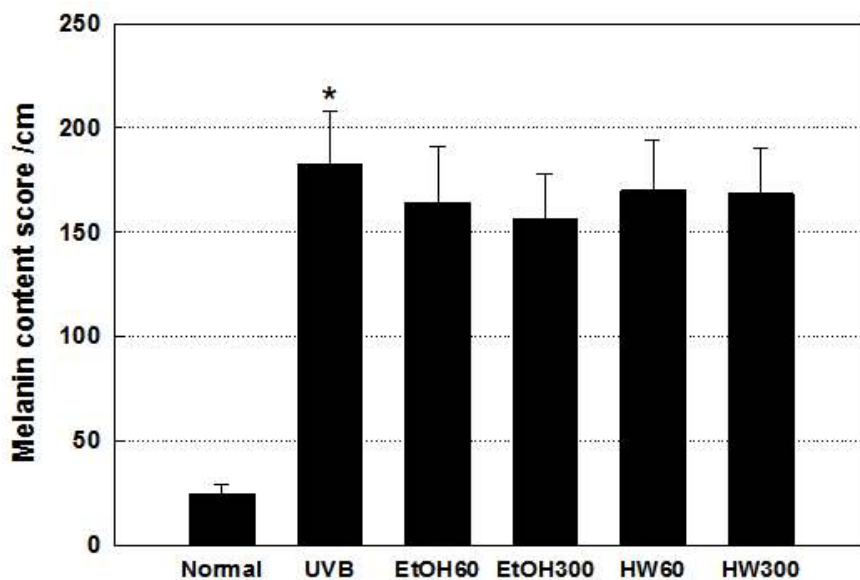


Fig 79. Histological melanin score of dorsal skins of brown guinea pigs exposed UVB. Mean±S.E.

*Significantly different from normal group (P<0.05).

다. DBA2 마우스(도포)에서의 미백 효능평가

(1) 재료 및 방법

(가) 실험동물

- ① 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 5주령 DBA2 마우스를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 마우스용 케이지에 3마리씩 수용함. 동물실험실의 환경은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 55 ± 10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Halran #2018을 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(나) 색소침착 유발

- ① 6주령에 DBA2 마우스의 등쪽 부위를 자외선 조사 하루 전 전기면도기로 제모한 후, UVB를 30 mJ/cm²를 격일로 10회 조사, 최종조사량이 300 mJ/cm²가 되도록 하여 색소침착을 유발함.

(다) 시험물질의 도포

- ① 시험물질은 정상군, UVB 유발군, 백장미 EtOH 추출물 저농도·고농도군, 백장미 HW 추출물 저농도·고농도등 6개군으로 나누어 200 μ l 씩 도포함(Table 17). 도포 기간은 자외선 조사 전 4주와 조사 종료시까지 하루 1회씩 시행함.

Table 17. Test groups for evaluation moisture-retaining ability in the DBA2 mice.

시험군	용량
1. Normal	vehicle
2. 유발군(UVB)	vehicle
3. WRPE-EtOH-저농도(EtOH60)	60 mg/kg (200 μ l)
4. WRPE-EtOH-고농도(EtOH300)	300 mg/kg (200 μ l)
5. WRPE-HW-저농도(HW60)	60 mg/kg (200 μ l)
6. WRPE-HW-고농도(HW300)	300 mg/kg (200 μ l)
6군	

(라) 색소침착 확인

- ① 색소 침착 정도를 분석하기 위해 피부 표면 상태를 디지털 카메라를 이용해 촬영하고, 색소침착 정도를 관찰함.

(마) 조직학적 검사

- ① 시험 종료 후, 등쪽 피부를 적출한 후 10 % 중성 formalin 용액으로 고정. 조직을

파라핀에 포매한 후 5 μm 의 조직절편을 만들고 Fontana-Masson 염색을 진행하여 피부조직의 조직학적 변화 및 melanin 침착 정도를 관찰하고, melanin content score 1점, melanin 5개 미만; 2점, melanin 5~10개; 3점, 100개 미만; 4점, 100개 이상으로 하여 cm당으로 합산하여 비교 분석함.

(2) 결과

(가) DBA2 마우스의 UV 조사에 의해 정상군에 비해 UVB 유발군이 검게 색소침착이 진행된 것이 확인됨. 이에 반해 EtOH 고농도와 HW 저농도, 고농도군은 유발군에 비해 색이 옅게 나타남(Fig. 80). 이들 피부조직에 대해 Fontana-Masson 염색을 시행한 결과 brown guinea pig에서와는 달리 정상군에서는 melanin 색소가 거의 관찰되지 않았으며, 유발군에서 관찰되는 melanin 색소 또한 guinea pig처럼 연속되어 나타나지 않고 드문드문 관찰되었으며 표피의 두께도 증가됨. 이에 반해 EtOH 고농도, HW 저농도, 고농도군에서는 melanin 색소가 매우 감소된 것으로 나타남(Fig. 81). melanin conten 분석 결과에서도 EtOH 고농도, HW 저농도, 고농도군의 melanin 수가 UVB 유발군에 비해 유의적으로 감소된 것으로 확인됨(Fig. 82).

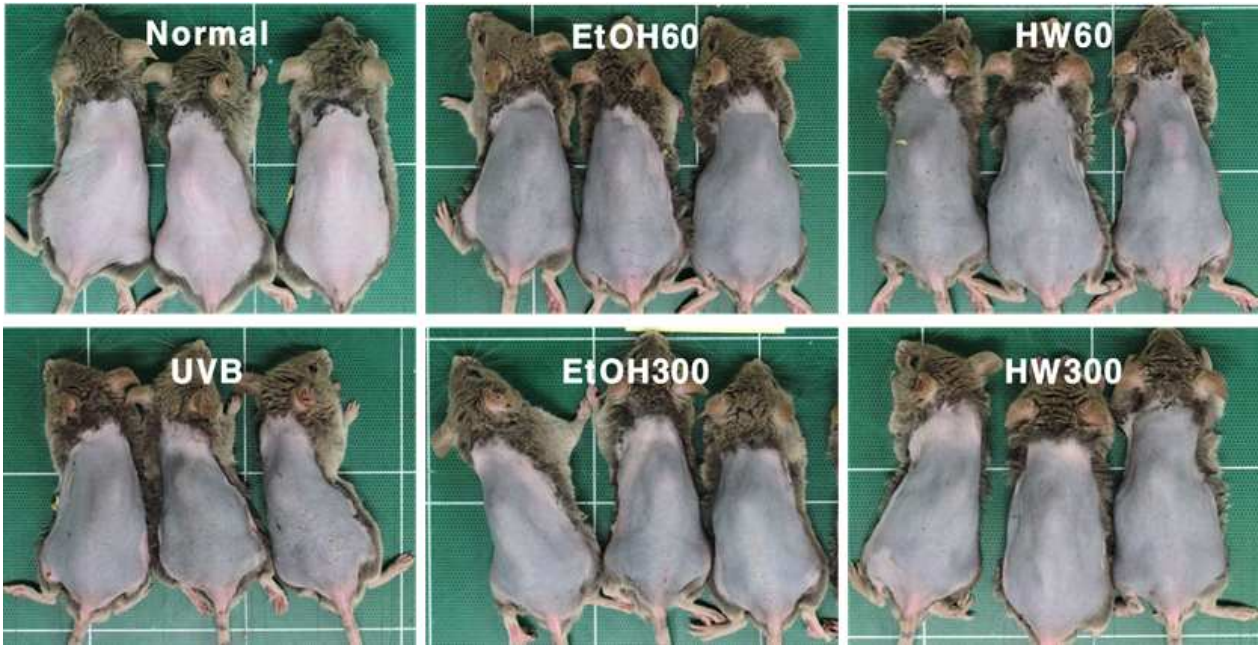


Fig 80. UVB-induced pigmentation by white rose extract on DBA2 mice.

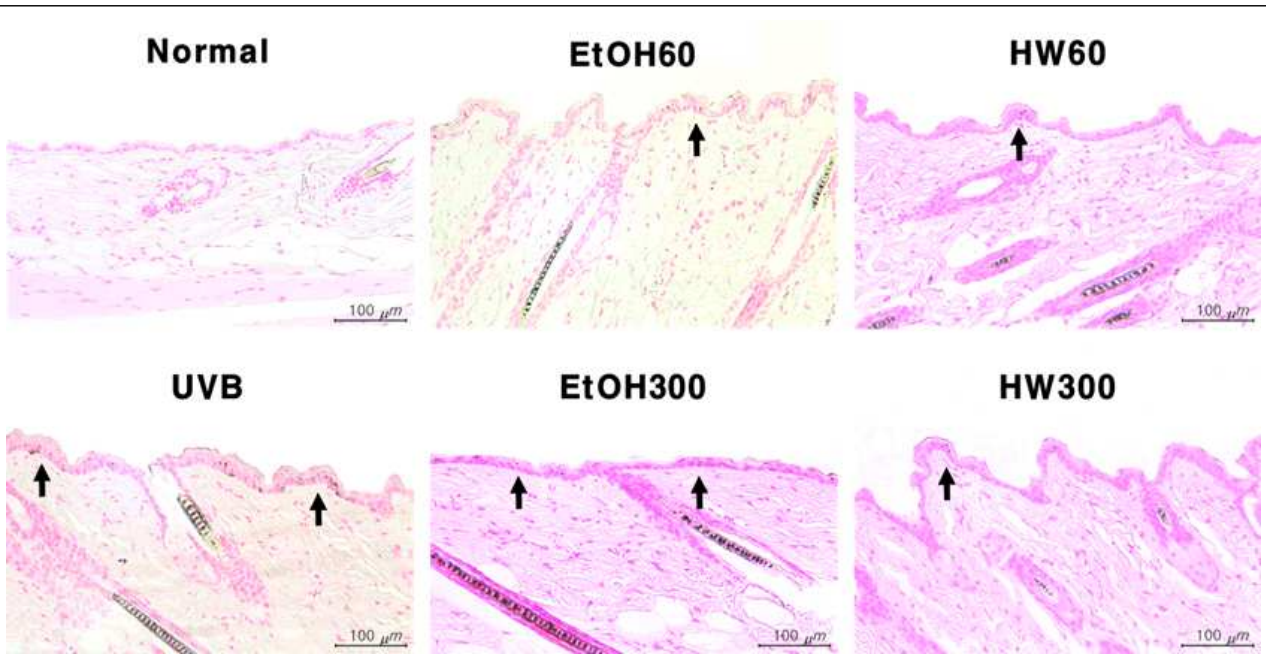


Fig 81. Histological examination of dorsal skins of DBA2 mice exposed UVB.
Fontana–Masson stain, X200.

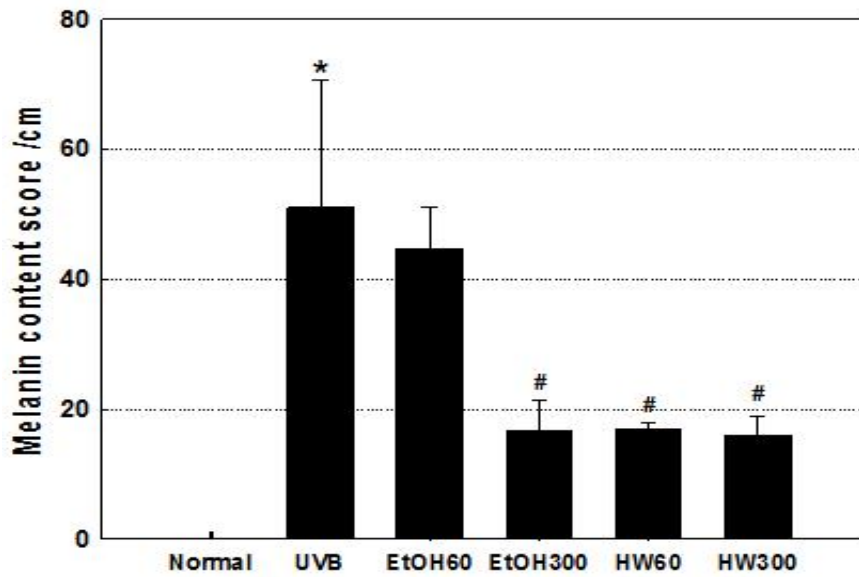


Fig 82. Histological melanin score of dorsal skins of DBA2 mice exposed UVB.
Mean±S.E.

*Significantly different from normal group (P<0.05).

#Significantly different from UVB group (P<0.05).

라. DBA2 마우스(경구)에서의 미백 효능평가

(1) 재료 및 방법

(가) 실험동물

- ① 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 5주령 DBA2 마우스를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 마우스용 케이지에 3마리씩 수용함. 동물실험실의 환경은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 55 ± 10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Halran #2018을 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(나) 색소침착 유발

- ① 6주령에 DBA2 마우스의 등쪽 부위를 자외선 조사 하루 전 전기면도기로 제모한 후, UVB를 30 mJ/cm²를 격일로 10회 조사, 최종조사량이 300 mJ/cm²가 되도록 하여 색소침착을 유발함.

(다) 시험물질의 투여

- ① 시험물질은 정상군, UVB 유발군, 백장미 EtOH 추출물 저농도·고농도군, 백장미 HW 추출물 저농도·고농도등 6개군으로 나누어 진행함(Table 18). 백장미 추출물군은 정제수에 각 용량에 따라 녹인 후 체중 kg당 10mL씩 마우스용 존대를 이용하여 경구반복 투여하였으며, 정상군과 유발군은 멸균 정제수만을 투여함. 투여기간은 색소침착 유발 전 4주와 유발 종료시까지 하루 1회씩 시행함. 도포기간은 자외선 조사 전 4주와 조사 종료시까지 하루 1회씩 시행함.

Table 18. Test groups for evaluation moisture-retaining ability in the DBA2 mice.

시험군	용량
1. Normal	vehicle
2. 유발군(UVB)	vehicle
3. WRPE-EtOH-저농도(EtOH60)	60 mg/kg
4. WRPE-EtOH-고농도(EtOH300)	300 mg/kg
5. WRPE-HW-저농도(HW60)	60 mg/kg
6. WRPE-HW-고농도(HW300)	300 mg/kg
6군	

(라) 색소침착 확인

- ① 색소 침착 정도를 분석하기 위해 피부 표면 상태를 디지털 카메라를 이용해 촬영하고, 색소침착 정도를 관찰함.

(마) 조직학적 검사

- ① 시험 종료 후, 등쪽 피부를 적출한 후 10 % 중성 formalin 용액으로 고정. 조직을 파라핀에 포매한 후 5 μm 의 조직절편을 만들고 Fontana-Masson 염색을 진행하여 피부조직의 조직학적 변화 및 melanin 침착 정도를 관찰하고, melanin content score 1점, melanin 5개 미만; 2점, melanin 5~10개; 3점, 100개 미만; 4점, 100개이상으로 하여 cm당으로 합산하여 비교 분석함.

(2) 결과

- (가) 정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험기간 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았음. 투여 전 각 동물은 고른 체중범위를 나타냈으며, 시험물질 투여기간 중 정상군을 포함한 모든 시험군에서 유의한 체중 변화는 나타내지 않음. DBA2 마우스에의 UV 조사로 정상군에 비해 UVB 유발군이 등부위 피부가 검게 색소침착이 진행된 것이 확인됨. 이에 반해 백장미 추출물을 경구투여한 군들에서는 열게 침착되거나 부분적으로만 색소침착이 나타나는 경향을 보임(Fig. 83). EtOH 저농도의 경우 등 중심부위 쪽에서 주로 검은 침착을 보였으며 특히 머리쪽으로 갈수록 열어지는 현상이 관찰되었음. EtOH 고농도군은 전체적으로 열은 색을 띄었고 머리부위보다는 꼬리쪽이 훨씬 열어진 것이 관찰됨. HW 저농도의 경우 EtOH 추출물과는 다르게 개체차가 심하게 나타났으며 머리와 꼬리 쪽으로 거의 침착되지 않은 개체가 관찰되었으며, HW 고농도에서는 개체차가 있기는 하나 저농도보다는 적으며 침착된 부위가 개체에 따라서는 EtOH 고농도보다 적은 개체도 관찰됨. 침착이 적게 일어난 부위로만 비교하면 EtOH 고농도보다 HW 고농도가 우수하며, 도포보다도 뛰어난 것으로 나타남. 그러나 피부조직에 대한 Fontana-Masson 염색에서는 도포의 결과에 훨씬 못 미치는 수치를 보임. 육안상에 뛰어난 미백효과를 보였던 HW 추출물군이 EtOH 추출물보다 melanin 수가 많은 것으로 나타남. EtOH 추출물군은 유의성은 나오지 않았지만 melanin content가 낮아져 있었으며, EtOH 고농도군의 경우 월등히 낮아진 수치를 보임(Fig. 84 and 85).



Fig 83. UVB-induced pigmentation by white rose extract on DBA2 mice.

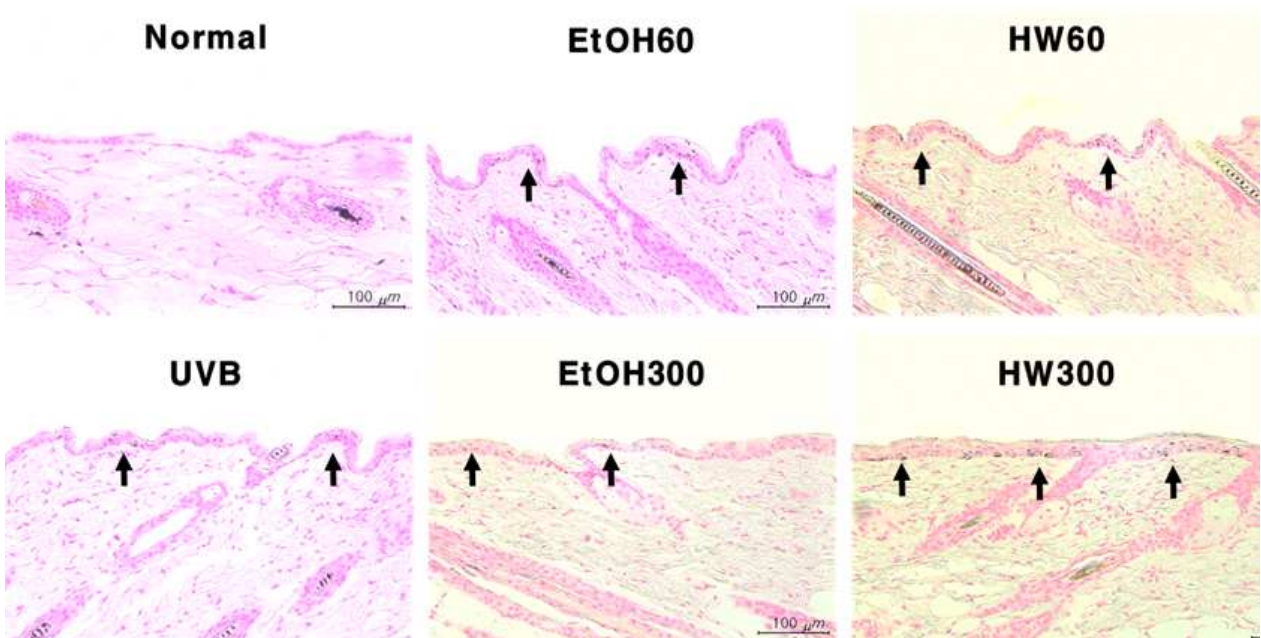


Fig 84. Histological examination of dorsal skins of DBA2 mice exposed UVB. Fontana-Masson stain, X200.

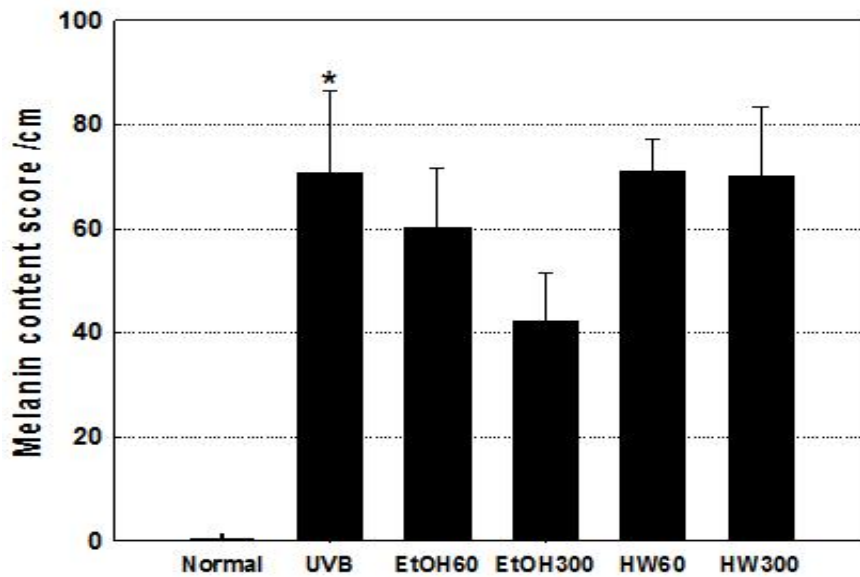


Fig 85. Histological melanin score of dorsal skins of DBA2 mice exposed UVB.
Mean±S.E.

*Significantly different from normal group (P<0.05)

(3) 고찰

(가) 많은 미백 성분이 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기속도결정단계에 관여하는 효소인 tyrosinase를 억제하는 작용기전이 있어, 백장미 추출물에 대해 *in vitro* tyrosinase 활성 억제시험을 실시함. 그 결과 백장미 EtOH 추출물이 적은 용량에서도 유의한 저해능을 보임에 따라 높은 생리활성을 가지는 것으로 나타남. 이에 *in vivo*에서는 미백효과를 측정하기 위해서 가장 많이 사용되고 있으며, UV에 의한 피부내 변화양상이 인체와 가장 유사한 모델인 brown guinea pig를 적용하여 백장미 추출물의 미백 효과를 유무를 확인하고 마우스의 색소침착 유발모델을 적용하여 최종적으로 백장미 추출물의 경구투여에 따른 미백효과를 제시하고자 하였음.

(나) Brown guinea pig에 백장미 추출물 또는 vehicle을 4주간 도포하고 이후 4주간 도포와 UV 조사를 병행하여 색소침착을 유발함. 그 결과 UVB(vehicle)만을 처리한 피부에서 색소침착이 유발되었음을 확인하였으며, 백장미 HW 추출물을 도포한 피부보다 EtOH 추출물을 도포한 피부의 침착정도가 더 약한 것으로 나타남. 특히 EtOH 고농도군에서 탁월한 미백효능이 있음을 확인함. 피부 조직에 대한 Fontana-Masson stain을 통해 피부조직내의 melanin 색소 침착정도를 분석한 결과에서도 UVB만을 처리한 피부가 조사하지 않은 피부에 비해 melanin content가 7.5배 증가된 것에 반해 백장미 추출물 도포군들은 전체적으로 낮은 수치를 보였으며, 육안결과와 같이 HW 추출물보다는 EtOH 추출물이 우수한 것으로 나타났으며, EtOH 고농도 도포군이 가장 우수한 것으로 확인됨.

- (다) DBA2 마우스에서의 백장미 추출물의 경구투여에 따른 미백 효능을 평가하기 전에, brown guinea pig와 같은 양상을 나타내는지 확인하는 단계로서 DBA2 마우스에 기니피그와 같이 백장미 추출물 및 vehicle을 등피부에 도포하여 미백효능을 평가함. 그 결과, DBA2 마우스의 등피부가 UV 조사에 의해 검게 색소침착이 진행되어 미백효능을 평가하기에 적합한 모델임을 확인하였고, 육안 관찰 및 조직학적 분석 결과에서 EtOH 고농도군에서의 효능이 확인됨에 따라 기니피그와 같은 기전으로 미백 효과를 나타내고 있는 것으로 판단함. 또한 DBA2 마우스 도포 모델에서는 기니피그에서는 명확하게 확인되지 않았던 HW 추출물의 유의적인 미백 효과까지 확인이 됨에 따라 마우스 모델이 기니피그 모델보다 더욱 민감하게 효과를 확인 할 수 있음을 보여줌.
- (라) 상기의 결과들을 토대로 DBA2 마우스 모델에 백장미 추출물 처치 경로를 도포에서 경구투여로 변경하여 진행함. 그 결과 육안관찰에서 도포보다도 경구에서 백장미 추출물의 미백효과가 더욱 우수한 것으로 나타남. 비록 조직학적 검사에서는 melanin content 수치가 육안관찰 결과와 다소 상이하게 나타났으나 이는 도포에서와는 달리 경구에서는 색소 침착 부위가 부분적으로 달리 나타난 점과 개체차가 심했던 것에 따른 것이라 생각됨. EtOH 추출물에서 농도의존적으로 미백 효과가 커진 것과 HW 추출물에서 농도가 높을수록 개체차가 적다는 점으로 미루어보아 백장미 추출물의 섭취 기간이 길수록 미백효과 및 개체차는 적어질 것으로 생각됨.
- (마) Brown guinea pig(도포) 및 DBA2 마우스(도포와 경구)에서의 결과를 종합하면, **백장미 추출물은 UV의 조사에 의해 유발된 색소침착을 효과적으로 억제하며, HW 추출물보다는 EtOH 추출물이 더욱 높은 미백효과를 가지고 있으며, 이러한 효과는 장기간의 섭취로 더욱 증대시킬 수 있음이 확인됨.**

6. 아토피 개선효능 평가(*in vivo* 아토피개선 평가모델)

가. 평가방법

- (1) 식약처 가이드라인 “알레르기 관련 기능성시험”에 준하여 국내외에 알려진 아토피개선 효과의 측정법을 참고하여 백장미 추출물이 아토피 개선 효능이 있는지를 평가하는 데에 그 목적이 있음. 따라서 compound 48/80을 이용한 급성 알러지 반응 및 DNFB를 이용한 만성 알러지 반응을 유도한 마우스에 백장미 추출물을 투여하여 아토피개선 효과를 제시하고자 함.

나. Compound 48/80 유도 전신성 급성 알러지 반응

- (1) 식약청 가이드라인 “알레르기관련 기능성시험 (pp. 745-791)”에 준하여 전신성 알러지 쇼크반응 (active systemic anaphylaxis, ASA)에 대한 백장미 추출물을 효과를 조사하기 위하여 compound 48/80에 의해 유도되는 anaphylaxis 모델을 사용하여 효과를 평가함.

(2) 재료 및 방법

(가) 실험동물

- ① 대한바이오템(음성, 한국)로부터 5주령 ICR 마우스를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 마우스용 케이지에 3마리씩 수용함. 동물실험실의 환경은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 55 ± 10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Halran #2018을 대한바이오템(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(나) 실험물질의 투여 및 반응 분석

- ① 급성 알러지 반응을 유도하기 30분 전에 시험물질을 농도별로 투여함. 시험물질의 투여는 알러지 반응 유도 경로인 복강내 투여(IP)와 임상 예상 경로인 경구 투여(PO)로 진행함. 복강내 투여에서는 각각의 시험물질을 1, 3, 10, 30, 100, 300 mg/kg의 농도로 적용하고, 경구내 투여에서는 100 과 300 mg/kg 농도만을 적용하여 시행. 투여 30분후 치사량의 mast cell degranulator인 compound 48/80 (8 mg/kg, 5 mL/kg)을 복강내 주사하고 60분간의 사망률을 검사하여 50% 이상의 동물을 생존시키는 용량을 제시함.

(3) 결과

- (가) Vehicle 투여(IP) 30분후 치사량의 compound 48/80을 복강내 주사한 유발군은 100%의 치사율을 보인데 비해, 백장미 EtOH 추출물 투여(IP)군은 3 mg/kg 이상의 농도부터 10% 이하의 낮은 치사율을 보임. HW 추출물 투여(IP)군 역시 3 mg/kg 이상의 농도부터 20% 이하의 낮은 치사율을 보임. 시험물질 투여경로를 복강에서 경구로 변경한 Vehicle 투여(PO) 30분후 compound 48/80을 복강내 주사한 유발군 또한 100%의 치사율을 보임. 이에 반해 EtOH 추출물 투여(PO)군은 100과 300 mg/kg의 농도 모두에서 80%의 치사율을 보였으며, HW 추출물 투여(PO)군은 100과 300 mg/kg의 농도에서 각각 60%와 80%의 치사율을 보임(Table 19).

Table 19. Effects of white rose petal extract (WRPE) on systemic anaphylactic shock induced by compound 48/80. IP, intraperitoneal injection; PO, per oral injection.

Treatment (mg/kg)	Compound 48/80 (mg/kg)	Mortality (%)
Normal(IP)	-	-
C48/80(IP-IP)	8	5/5 (100)
WRPE-EtOH (IP-IP)	8	7/10 (70)
	1	8
	3	1/10 (10)
	10	0/10 (0)
	30	1/10 (10)
	100	1/10(10)
	300	1/10 (10)
WRPE-HW (IP-IP)	8	9/10 (90)
	1	8
	3	2/10 (20)
	10	0/10 (0)
	30	2/10 (20)
	100	1/10 (10)
	300	0/10 (0)
Vehicle(PO-IP)	8	5/5 (100)
WRPE-EtOH (PO-IP)	8	8/10 (80)
	300	8/10 (80)
WRPE-HW (PO-IP)	8	6/10 (60)
	300	8/10 (80)

다. Compound 48/80 유도 국소성 급성 알러지 반응

(1) 재료 및 방법

(가) 실험동물

- ① 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 5주령 ICR 마우스를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 마우스용 케이지에 3마리씩 수용함. 동물실험실의 환경은 온도 23±2 °C, 상대습도 55±10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Halran #2018을 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(나) 실험물질의 투여

- ① 실험은 정상군, Compound 48/80(C48/80) 유발군, 백장미 EtOH 추출물 저농도(30 mg/kg)·중간농도(100 mg/kg)·고농도군(300 mg/kg), 백장미 HW 추출물 저농도·중간농도·고농도등 8개군으로 나누어 진행함. 백장미 추출물군은 정제수에 각 용량에 따라 녹인 후 체중 kg당 10mL씩 마우스용 존대를 이용하여 경구반복 투여하였으며, 정상군과 유발군은 멸균 정제수만을 투여함. 투여기간은 알러지 반응 유발 전 4주동안 하루 1회씩 시행함.

(다) 국소성 급성 알러지 유발 및 알러지 반응 억제효과 분석

- ① 마지막 투여 30분후 5 mL/kg의 1% Evan's blue를 미정맥내로 주사하고 compound

48/80 (50 μg / 50 μl /site)을 등부위에 피내주사하여 감각시킴.

- ② 감각 후 60분간 scratching behaviors(가려움증)을 측정하여 가려움증을 유의하게 줄여 주는 용량을 제시.
- ③ 관찰 종료 후 생리식염수를 좌심실을 통해 전신의 혈액을 관류제거하고, 주사부위 피부를 절제하여 피하출혈여부를 관찰함. 출혈반점 포함 피부를 잘라내어 3일간 formamide로 용출시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하여 Evan's blue를 정량함으로써 부종완화 효능을 제시

(2) 결과

- (가) 정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험기간 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았음.
- (나) 투여 전 각 동물은 고른 체중범위를 나타냈으며, 시험물질 투여기간 중 정상군을 포함한 모든 시험군에서 유의한 체중 변화는 나타내지 않음.
- (다) 마지막 투여 30분후 mast cell degranulator인 compound 48/80을 피내로 주사하고 60분간 scratching behaviors을 측정한 결과, 유의적이지는 않지만 백장미 EtOH 추출물 투여군이 C48/80 유발군에 비해 가려움증이 감소된 경향을 보임(Fig. 86). 국소성 알러지 유발 피부 조직을 적출하여 Evan's blue를 정량한 결과는 정상군을 제외하고 알러지를 유발한 군간 비교로 진행함. 그 결과 HW 추출물보다는 EtOH 추출물이 부종 완화에 우수한 것으로 나타남(Fig. 87).

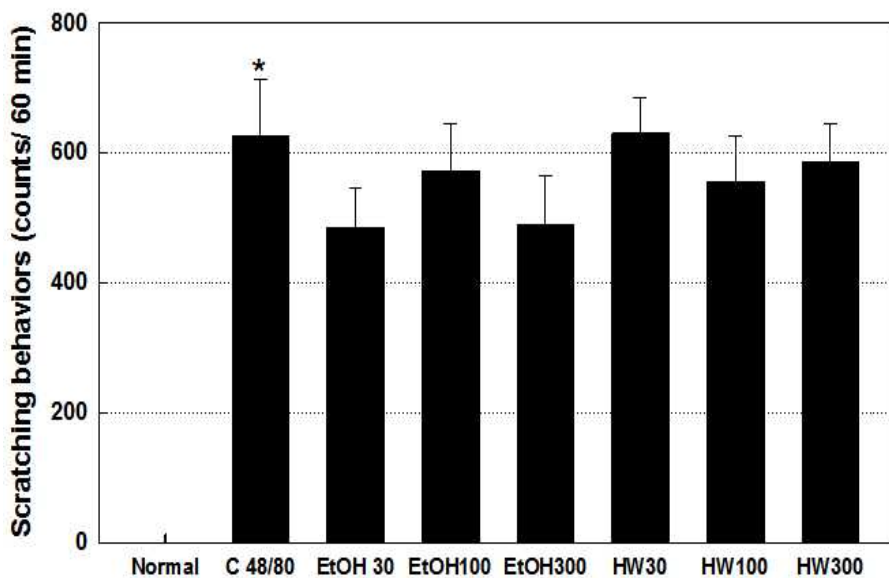


Fig 86. Effect of 30-day repeated oral treatment with white rose extract on the scratching behavior (Counts/ 60 min) induced by compound 48/80 (50 μg /site).

Mean \pm S.E.

*Significantly different from normal group (P<0.05).

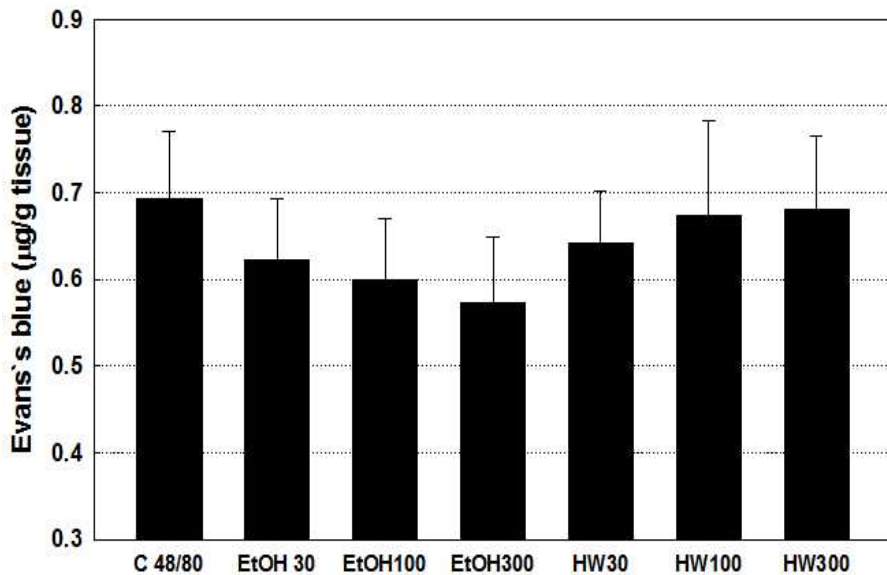


Fig 87. Effect of 30-day repeated oral treatment with white rose extract on the edema formation (Evan's blue leakage) induced by compound 48/80 (50 µg/site). Mean±S.E.

다. BALB/C 마우스에서 DNFB 유도 만성 아토피 피부염

(1) 상기의 국소성 급성 알러지 반응에 대한 결과와 본 연구팀의 다년간의 연구경력에 근거하여 백장미 추출물의 만성 아토피 피부염 효능은 당초 계획되었던 NC/Nga 마우스에 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)로 유도한 아토피 피부염보다는 BALB/C 마우스에 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)로 유도한 접촉성 아토피 피부염이 더 적합할 것이라 판단하여 변경하여 진행함.

(2) 재료 및 방법

(가) 실험동물

① 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 4주령 암컷 BALB/C 마우스를 공급받아 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용. 동물은 마우스용 케이지에 3마리씩 수용함. 동물실험실의 환경은 온도 23±2 °C, 상대습도 55±10 %, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Halran #2018을 대한바이오링크(음성, 한국)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록함. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행됨.

(나) 실험물질의 투여

① 시험물질은 정상군, UVB 유발군, 백장미 EtOH 추출물 저농도·고농도군, 백장미 HW 추출물 저농도·고농도등 6개군으로 나누어 진행함(Table 20). 백장미 추출물군

은 정제수에 각 용량에 따라 녹인 후 체중 kg당 10mL씩 마우스용 존대를 이용하여 경구반복 투여하였으며, 정상군과 유발군은 멸균 정제수만을 투여함. 투여기간은 아토피 피부염 유발 전 4주와 유발 4주까지 총 8주간 하루 1회씩 시행함.

Table 20. Test groups for evaluation moisture-retaining ability in the BALB/C mice.

시험군	용 량
1. Normal	vehicle
2. 유발군(DNFB)	vehicle
3. WRPE-EtOH-저농도(EtOH60)	60 mg/kg
4. WRPE-EtOH-고농도(EtOH300)	300 mg/kg
5. WRPE-HW-저농도(HW60)	60 mg/kg
6. WRPE-HW-고농도(HW300)	300 mg/kg
6군	

(다) 만성 아토피 피부염 유발

- ① 시험물질 투여 27일째에 마우스의 등부위를 clipper와 Depilatory creams((Veet®, Reckitt Benckiser, France)로 제모하고 28일째(4주) 시험물질 투여 30분 후 유발물질인 0.3 % DNFB용액(acetone:olive oil = 3:1) 150 μ l을 제모한 등부위에 도포하여 감각함. 감각 5일째부터 시험물질 투여 30분 후 0.05 % DNFB를 등부위에 격일로 9회 반복 도포함(4주).

(라) 아토피 피부염 개선효능 평가

- ① 마지막 도포 다음날 육안관찰을 통해 농양성 염증, 출혈, 습진, 가피탈피 등의 피부염 관련 병변을 확인.
- ② 조직병리학적 관찰을 위해 적출한 피부조직에 대해 H&E 염색으로 피부반응에 대한 조직병리학적 소견 scoring하고, toluidine blue 염색으로 mast cell degranulation 정도를 관찰함.
- ③ 혈청을 얻어 total IgE 분석하고, 효과가 인정될 경우 혈청 TNF- α , IL-4, IL-6 등의 cytokines과 histamine을 분석

(3) 결과

- (가) 정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험기간 동안 시험물질에 의해 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았음.
- (나) 투여 전 각 동물은 고른 체중범위를 나타냈으며, 시험물질 투여기간 중 DNFB 유발에 따른 체중감소가 나타났으나 유의한 체중 변화는 나타내지 않음(Fig. 88).
- (다) DNFB의 반복 도포는 농양성 염증, 출혈 및 가피탈피 등의 피부염을 유발하였고, 백장미 EtOH 추출물과 HW 추출물 모두 고농도에서 증상이 개선되어 있는 것이

관찰됨(Fig. 89).

- (라) 시험 종료 후 적출한 피부조직에 대해 H&E 염색으로 조직병리학적 검사를 시행한 결과, DNFB 유발군에서 만성 아토피 피부염에서 관찰되는 표피두께의 증가(피부조직의 비후)가 나타났으며(Fig. 89), 두께 측정에서도 정상군에 비해 10배이상 증가된 것으로 확인됨(Fig. 91). 이에 반해 백장미 추출물을 투여한 모든 군은 유의적으로 표피의 두께가 감소되어 있었으며, HW 저농도 > EtOH 저농도 > HW 고농도 > EtOH 고농도 순으로 나타나 육안관찰에서와 마찬가지로 고농도군들에서 탁월한 개선효능이 있음이 확인됨.
- (마) 알러지 반응을 일으키는 과정에서 중요한 역할을 하는 비만세포의 탈과립(mast cell degranulation) 정도를 분석하기 위해 toluidine blue 염색을 시행하였고, 염색된 비만세포의 수를 측정함. 그 결과 정상군에서는 비만세포가 거의 관찰되지 않은 것에 반해 DNFB 유발군에서는 표피 밑으로 다량의 탈과립형 비만세포가 관찰됨. 백장미 추출물 투여군은 모두 유발군에 비해 적은 양을 나타냈는데 특히 EtOH 고농도군에서 매우 감소되어 있는 것으로 관찰됨(Fig. 92). 객관적 분석을 위해 면적당 비만세포의 수를 측정한 결과에서도 백장미 추출물 투여군은 유의하게 감소되어 있었는데, HW 추출물의 경우 고농도 군에서 가장 뛰어난 개선 효과를 보였으나 저농도군과 차이가 큰 반면, EtOH 추출물 저농도와 고농도는 농도에 상관없이 비슷한 수치 of 개선효과를 보임(Fig. 93).
- (바) 혈청 내 존재하는 IgE는 비만세포와 결합하여 세포를 활성화시켜 염증을 일으키는 중요한 인자로 작용함에 따라 혈청 내 IgE 수준을 ELISA를 통해 측정함. 그 결과 DNFB 유발군은 정상군에 비해 IgE가 4.8배 증가되어 있었으며, 백장미 추출물 투여군은 비만세포의 탈과립 정도 분석에서와 같이 모든 군이 감소된 것으로 나타났으며, 가장 탁월한 효능을 보였던 HW 고농도 군 역시 유의하게 감소함을 보임(Fig. 94A). 그러나 아토피 피부염에서 IgE 증가와 함께 관찰되는 eosinophils 증가는 백장미 HW 추출물에서만 감소함을 보였으며 고농도보다 저농도가 더욱 우수한 것으로 나타남(Fig. 94B). 혈청 내 IgE 수준에서 효과가 인정되었기에 추가적으로 IgE를 유도하는 IL-4(Fig. 94C), IL-6(Fig. 94D)등의 cytokines을 분석한 결과에서도 백장미 추출물 투여군 모두 유발군에 비해 유의하게 감소되었음을 확인함.

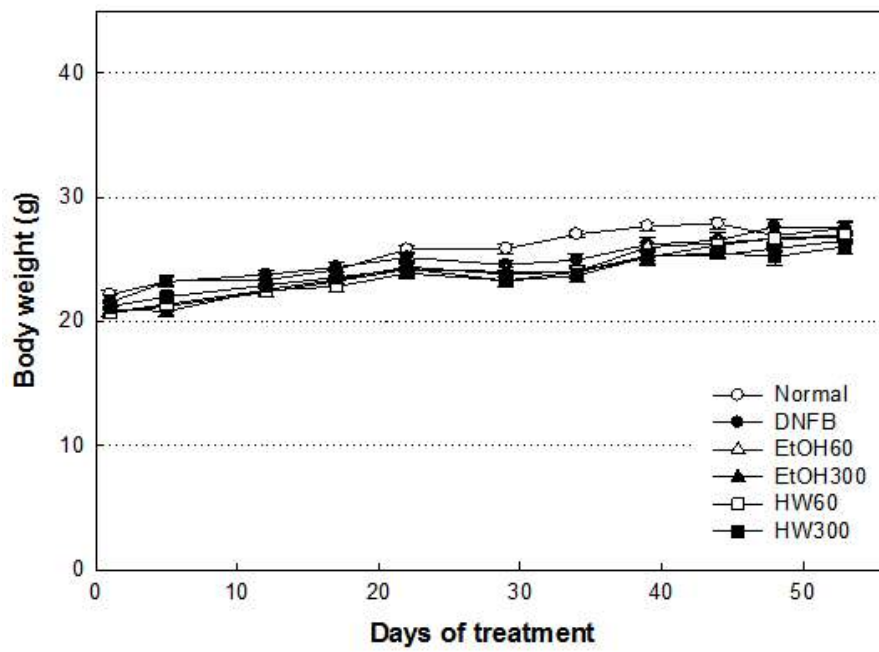


Fig 88. Body weight changes in BALB/C mice orally treated with test materials.
Mean±S.E.

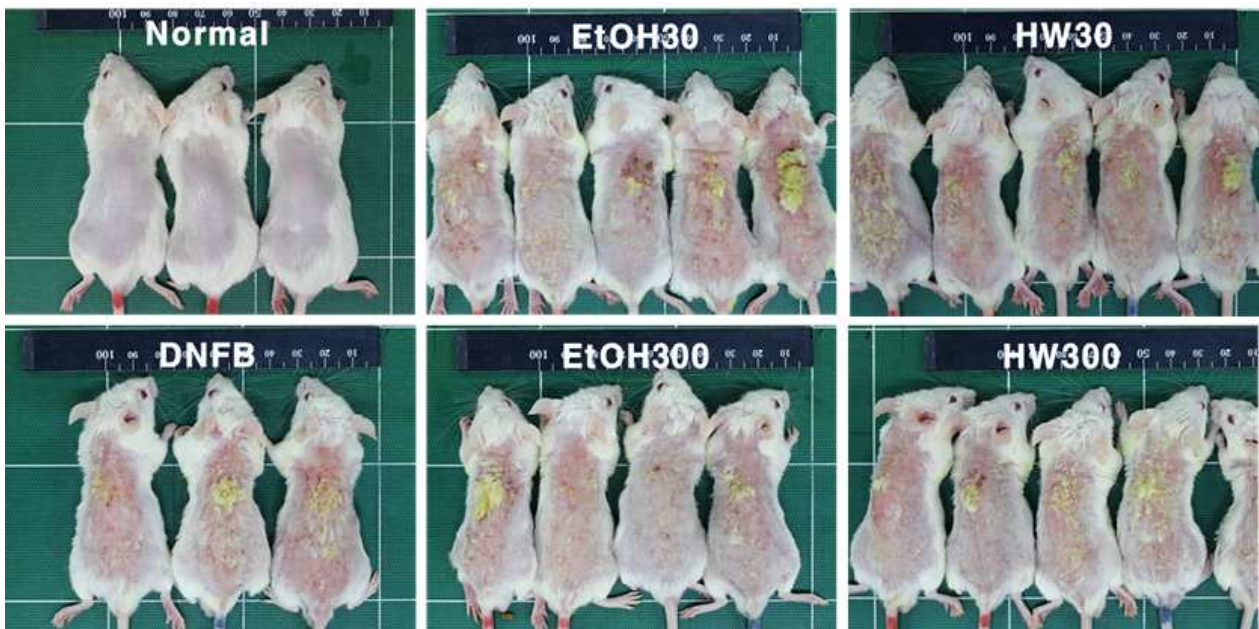


Fig 89. DNFB-induced chronic atopic dermatitis by white rose extract on BALB/C mice.

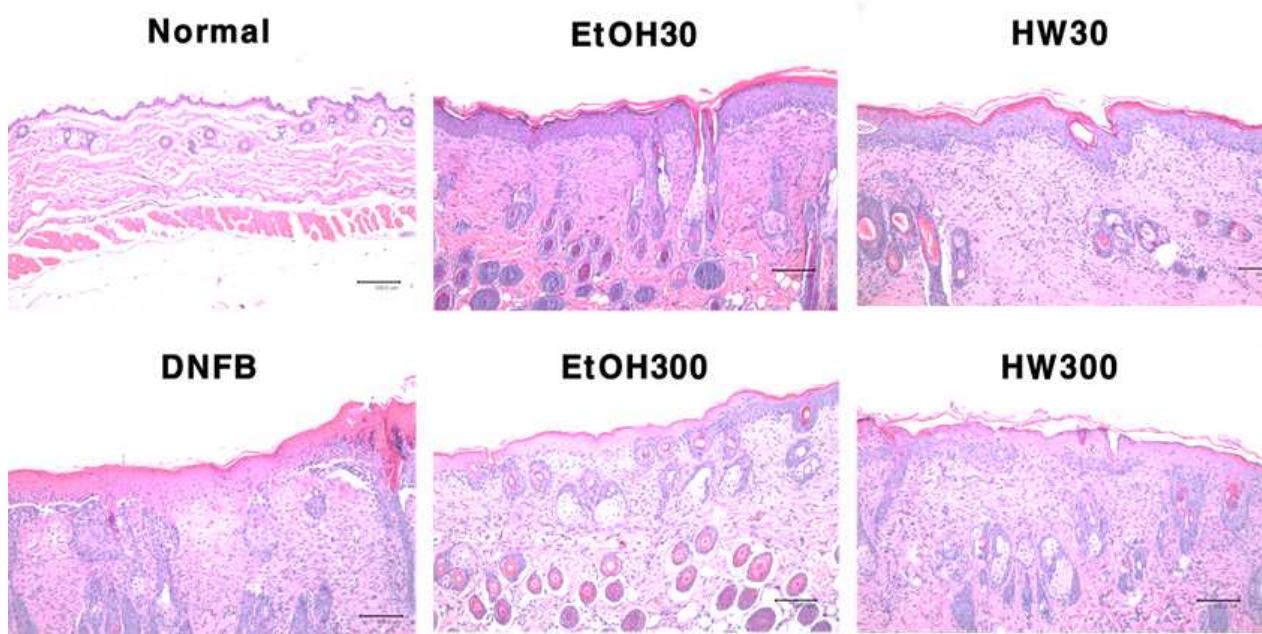


Fig 90. Histopathological changes in DNFB-induced chronic atopic dermatitis. H&E stain, X200.

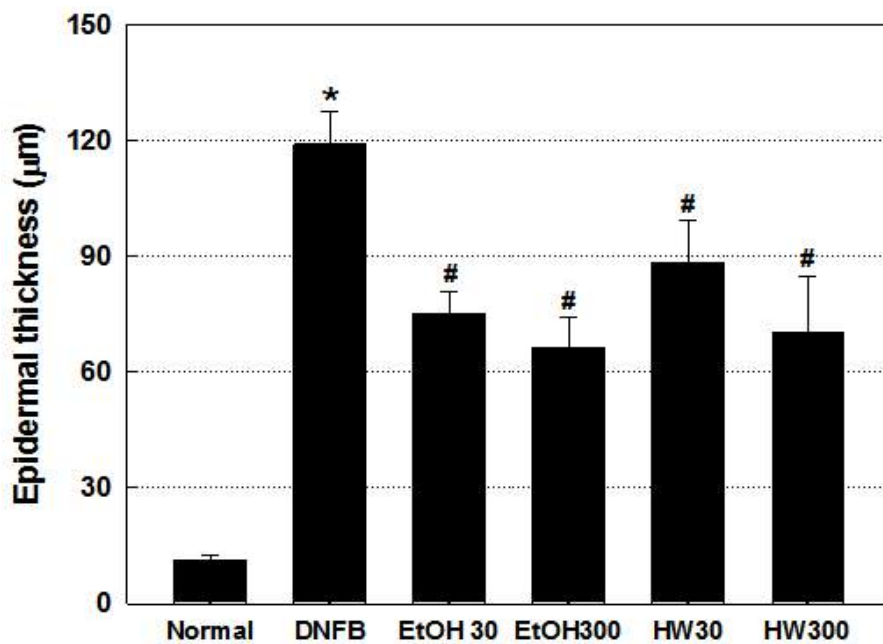


Fig 91. Epidermal thickness changes in DNFB-induced chronic atopic dermatitis. Mean±S.E.

*Significantly different from normal group (P<0.05).

#Significantly different from DNFB group (P<0.05).

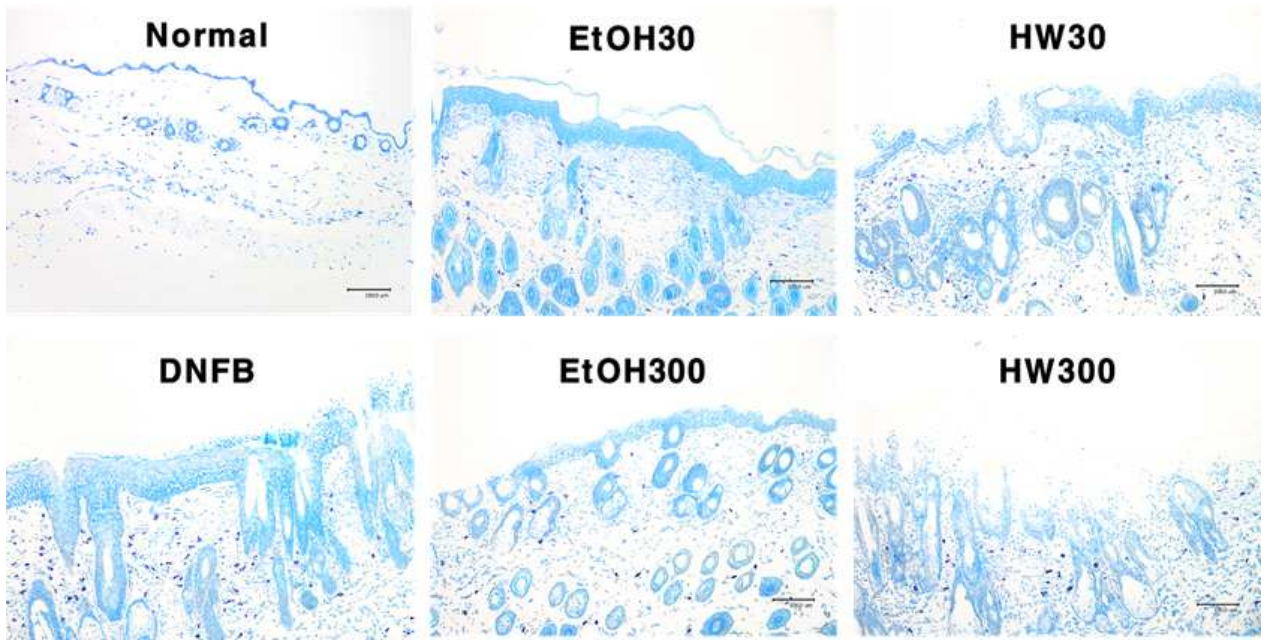


Fig 92. Histopathological changes in DNFB-induced chronic atopic dermatitis. Toluidine blue stain, X200.

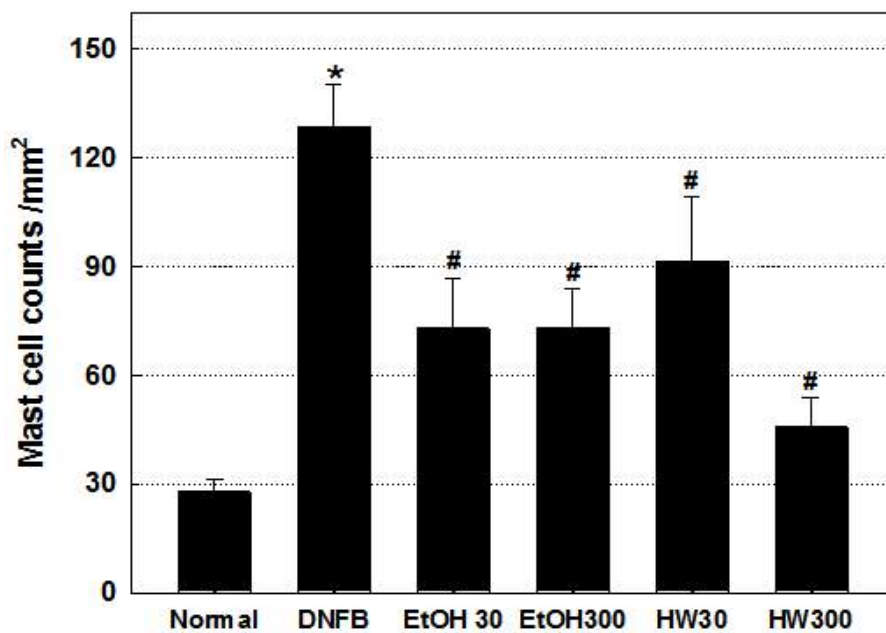


Fig 93. Mast cell counts in DNFB-induced chronic atopic dermatitis. Mean±S.E.

*Significantly different from normal group (P<0.05).

#Significantly different from DNFB group (P<0.05).

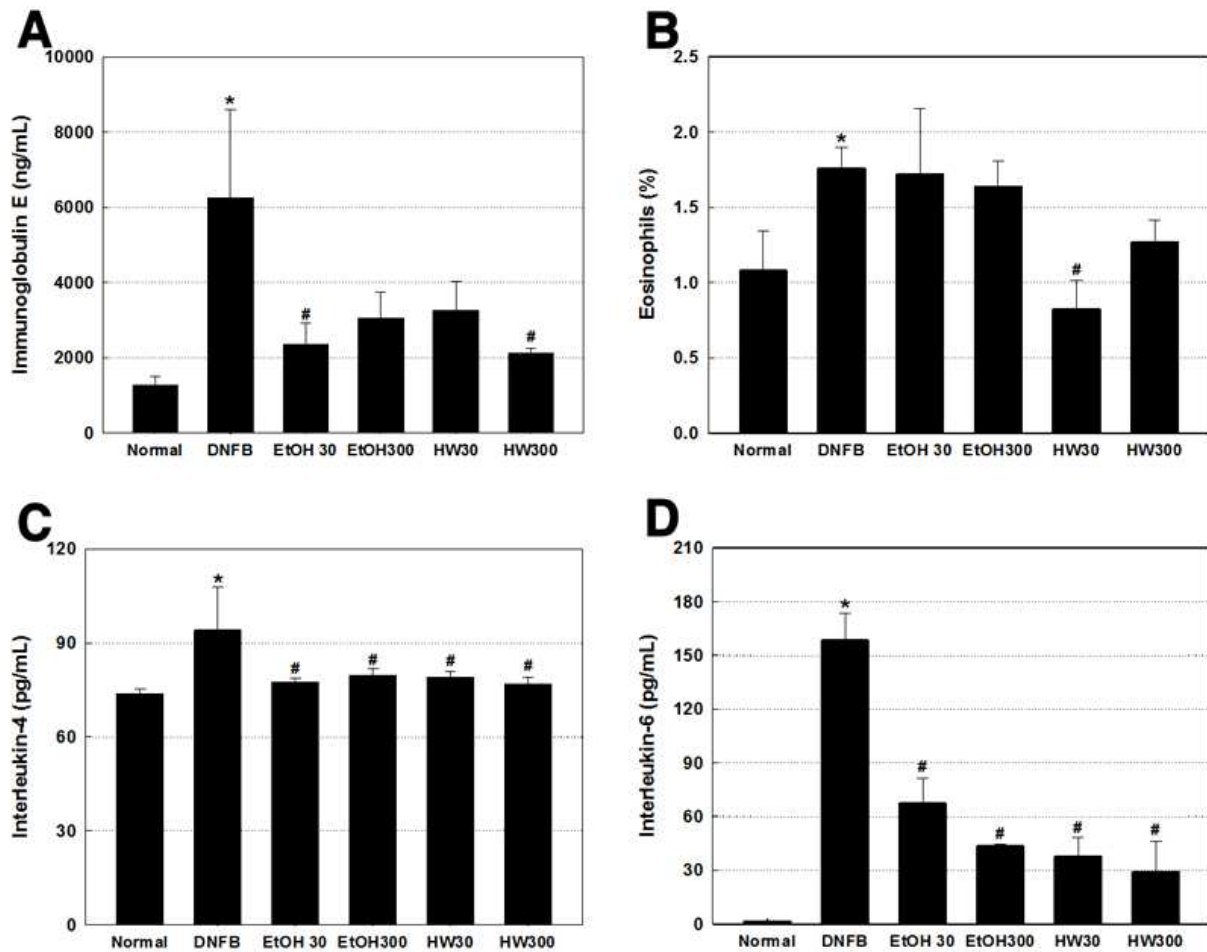


Fig 94. Blood levels of IgE (A), eosinophils (B), IL-4 (C) and IL-6 (D) in mice with DNFB-induced chronic atopic dermatitis. Mean±S.E.

*Significantly different from normal group (P<0.05).

#Significantly different from DNFB group (P<0.05).

(4) 고찰

(가) 아토피 피부염은 주된 증상으로 피부발진과 가려움증을 호소하며, 대부분 유소아기에 발생하는 염증성 피부질환임. 이러한 아토피 피부염을 치료하기 위한 다양한 의학적 접근이 시도되어 왔으며, 이중 약물치료법으로 항히스타민제, 면역억제제, 항생제, 스테로이드제 등이 주로 사용되어 왔음. 그러나 장기간 치료 시 부작용과 내성이 문제가 되어 최근에는 천연물 유래 치료제 개발에 대한 높은 관심이 대두되고 있음.

(나) 본 연구팀은 이전의 연구에서 백장미 fraction 추출물이 급성 알러지 반응에 대해 효과가 있음을 확인한 바 있어 본 연구에서는 이번 연구에서 개발된 백장미 추출물을 이용하여 compound 48/80을 이용한 급성 알러지 반응 및 DNFB를 이용한 만

성 알러지 반응을 유도한 마우스에 백장미 추출물을 투여하여 아토피개선 효과를 제시하고자 함.

- (다) 전신성 알러지 쇼크반응 (active systemic anaphylaxis, ASA)에 대한 백장미 추출물을 효과를 조사하기 위하여 compound 48/80에 의해 유도되는 anaphylaxis 모델을 사용하여 개선효과를 평가한 결과 알러지 반응 유도 경로(복강내 투여)와 같은 경로로 백장미 추출물을 투여했을 때 백장미 EtOH 추출물 투여군은 3 mg/kg 이상의 농도부터 10 % 이하의 낮은 치사율을 보이고 HW 추출물 투여군 역시 3 mg/kg 이상의 농도부터 20 % 이하의 낮은 치사율을 보이는 것을 확인함. 시험물질 투여경로만을 임상예정 경로인 경구로 변경한 실험에서도 EtOH 추출물과 HW 추출물에서 80 %미만의 치사율을 확인함으로써 급성 알러지 반응에 백장미 추출물 개선효과의 가능성을 확인함.
- (라) 국소성 급성 알러지 반응에서의 개선효과를 평가하기 위해 4주간 백장미 추출물을 투여하고 마지막 투여 30분 후 mast cell degranulator인 compound 48/80을 피내로 주사하고 60분간 scratching behaviors을 측정된 결과, 백장미 EtOH 추출물이 C48/80 유발에 따른 가려움증을 감소시켜줌을 확인함. 또한 국소성 알러지 유발 피부 조직을 적출하여 Evan's blue를 정량하여 부종 완화 효능을 평가하여 HW 추출물보다는 EtOH 추출물이 부종 완화에 더 우수한 것을 확인함.
- (마) 마지막으로 BALB/C 마우스에 DNFB를 사용한 만성 아토피 피부염에 백장미 추출물을 적용을 때의 개선효과를 평가함. DNFB의 반복 도포로 농양성 염증, 출혈 및 가피탈피 등의 피부염이 관찰되어 적용된 모델이 아토피 피부염 개선효능 평가에 적합함 확인함. 이러한 증상에 대해 백장미 EtOH 추출물과 HW 추출물 모두 고농도에서 증상이 개선되는 것으로 나타남. 조직병리학적 검사에서도 DNFB 유발군에서는 만성 아토피 피부염에서 관찰되는 표피두께의 증가(피부 조직의 비후)가 나타남에 반해 백장미 추출물을 투여한 모든 군이 유의하게 피부의 두께가 얇아져 있는 것을 확인함. 알러지 반응을 일으키는 과정에서 중요한 역할을 하는 비만세포의 탈과립(mast cell degranulation) 정도를 분석하기 위해 피부조직내 탈과립형 비만세포의 수를 측정된 결과에서도 DNFB 유발군에서는 표피 밑으로 다량의 탈과립형 비만세포가 침착된 것에 반해 백장미 추출물 투여군은 모두 유의하게 감소함을 보여 주어 백장미 추출물이 아토피 피부염 개선에 효과적인 물질임을 확인함. 아토피 피부염의 지표로도 사용되고 있는 IgE는 혈청 내 존재하는 IgE가 비만세포와 결합하여 세포를 활성화시켜 염증을 일으키는 것으로 알려져 있음. 본 연구에서는 DNFB의 유발로 IgE증가뿐만 아니라 eosinophils 증가, IgE를 유도하는 cytokines IL-4, IL-6가 증가됨을 확인하였으며, 이러한 증상들을 백장미 추출물이 탁월하게 감소시키는 것으로 나타났으며 EtOH 추출물의 경우 저농도와 고농도의 차이가 크지 않은 것으로 미루어보아 일정농도 이상에서는 개선 효과를 가진다는 것과 HW 추출물의 경우 농도의존적으로 개선효과를 가지며, HW 고농도의 경우 염증과 관련된 지표 (mast cell, IgE, IL-4 및 IL-6)에서는 EtOH 추출물보다도 더 뛰어난 것을 확인함. 따라서 백장미 추출물은 알러지 반응을 감소시켜 주는 효능이 있으며 만성 아토피

피부염에 대해서는 EtOH 추출물과 HW 추출물 모두 뛰어난 효과를 가지는 것으로 확인됨. 다른 연구결과들을 고려하면 이러한 효과는 장기간의 섭취로 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 사료됨.

5절 백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발과 장내 미생물의 미치는 영향

1. 백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발

가. 기능성 성분 강화 활성 미생물과 미생물 stock의 확보

(1) *in silico* 분석으로 균주 선발

(가) 백장미 추출물의 주요성분인 gallic acid를 pyrogallol로 전환시키는 phenolic acid decarboxylase(PAD) 유전자를 가지는 공시균주 선발하기 위해서 KEGG, NCBI, BioCYC, IMG유전자 Database를 이용하였음. 그 결과, 총 14 개 균주 검색 되었고, *Bacillus licheniformis* 와 *Saccharomyces cerevisiae* 제 외한 14 개 균주가 유산균으로 그 중 분양이 가능한 균주 6개 와 분리 균주 선행 연구에서 *E. hirae*를 확보하였음.

Table 21. List of bacteria (phenolic acid decarboxylase; PAD)

Strains	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Weissella koreensis</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Weissella koreensis</i>

(2) 공시 균주의 phenolic acid decarboxylase (PAD) 활성 측정

(가) *in silico* 분석 통해 PAD 유전자를 가지는 공시 균주의 생물 전환 효소 활성 유무를 확인하기 위해, gallic acid (1mM)가 첨가된 BHI broth에 각 공시 균주를 접종한 후 혐기 조건으로 37 °C, 0/12/24/48 시간 동안 배양 후 HPLC로 분석하여 pyrogallol로 전환 유무를 확인하였음. 그 결과, gallic acid는 7 균주 모두 pyrogallol로 전환하였음.

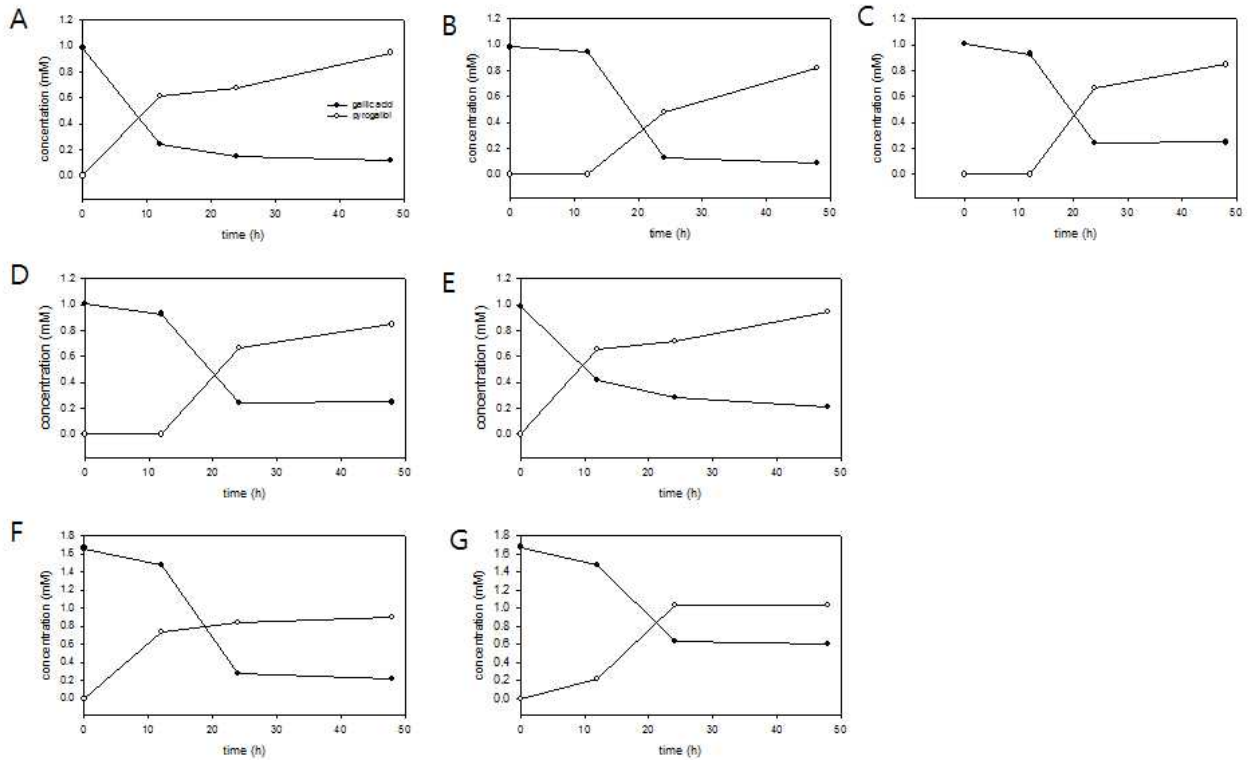


Fig 95. Bioconversion of gallic acid by LAB: A; *Lb. platarum*, B; *Lb. reuteri*, C; *Lb. paracasei*, D; *Lb. brevis*, E; *Lc. lactis* subsp. *lactis*, F; *E. hirae*, G; *E. faecium*.

나. 미생물 활용 대량 탐색기술 확보 및 라이브러리 구축

(1) 선택배지 및 RAPD Method 방법 구축

Table 22. The selective media used for culture dependant isolation method

Bacterial group	Medium	Condition	Time (h)	Temperature (°C)
Total anaerobes	WCA (Wilkins-Chalgren Agar)	Anaerobic	24	37
Total aerobes	TSA (Trypticase Soy Agar)	Anaerobic	24	37
Lactic acid bacteria	MRS	Anaerobic	24	37
<i>Lactobacillus</i> sp.	LBS	Anaerobic	48	37
<i>Bifidobacterium</i>	DHL	Anaerobic	48	37
<i>Leuconostoc</i> sp.	PES	Anaerobic	24	37
<i>Bifidobacterium</i> sp.	BS Bifidobacterium selective medium	Anaerobic	48	37

(가) 백장미 추출물의 주요성분인 rutin/gallic acid 의 생물전환 미생물을 분리 후, 같은 균주를 분류하기 위해 실시하기 위해 RAPD-PCR(Randomly Amplified

Polymorphic DNA PCR) 방법을 이용 하였으며, 대표적인 Probiotics인 bifidobacteria와 stapylococci, lactobacilli를 분류 용 primer인 OPL5 (5' ACG CAG GCA C-3')과 OPX14 (5'-ACA GGT GCT G-3')를 사용하였고, PCR 조건은 95 °C에서 5분 동안 initial denaturation 단계하고 95 °C 60 s의 35cycle; 45 °C 60 s; 72 °C 60 s; 그리고 마지막 cycle 72 °C 10분인 조건으로 수행하였음. RAPD-PCR 로 분류한 균주는 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')과 1492R (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')를 primer로 사용하여 PCR 후 염기 서열을 BLAST 분석 을 실시하여 균주를 동정하였음.

다. 미생물을 대량 탐색기술을 이용하여 선발

(1) 백장미 추출물의 주요 성분의 생물전환 미생물 분리

(가) 백장미 추출물의 주요 성분인 rutin/gallic acid 생물전환 미생물 분리를 위해서 지난 6개월 동안 대장 관련 질환 및 항생제를 섭취하지 않은 건강한 사람의 분변을 이용하여 선택 배지에 도말 하였고, 혐기조건에서 37°C, 36시간 동안 배양하였음. 선택 배지에서 자란 Colony를 계대 배양 후 rutin (1mM) 과 gallic acid (1mM) 가 첨가 된 BHI broth에 접종한 후 혐기 조건으로 37 °C, 36시간 동안 배양 후 HPLC로 분석하여 rutin과 gallic acid의 생물학적 전환 유무를 확인하였음. HPLC 분석조건은 (Table 23)와 같음.

Table 23. HPLC analysis condition for polyphenols

HPLC	Agilent 1260 Infinity		
Column	ZORBAX SB-C18		
Mobile phase	A : water/85 % <i>o</i> -phosphoric acid(99.5/0.5 v/v) B : acetonitrile/water/85 % <i>o</i> -phosphoric acid (50/49.5/0.5 v/v/v)		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	90	10
	5.0	90	10
	33.0	18	82
	33.1	90	10
Run time	38 min		
Injection volume	25 μ l		
Wave length	255 nm		
Flow rate	1 ml/min		
Column temperature	22 °C		

(2) β -glucosidase와 α -rhamnosidase활성 측정

(가) 생물전환 분리 미생물의 rutin을 전환시키는데 관여하는 효소의 활성을 확인 하기 위해 β -glucosidase와 α -rhamnosidase활성을 측정하였음. 8시간 동안 BHI broth에 배양시킨 균주는 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리를 하여 팔렛을 얻었고 이것을 50mM sodium phosphate buffer에 다시 풀어 주었고 이것을 whole-cell로 사용하였음. 이것을 다시 비드비터로 처리하여 세포를 파쇄 후 원심분리하여 상등액을 얻었고 그것을 cell-free extract로 사용하였음. 효소 활성을 보기 위해 β -glucosidase와 α -rhamnosidase의 기질은 각각 p-nitrophenyl- β -glucopyronoside와 p-nitrophenyl- α -rhamnopyranoside를 사용하였음. 각각의 기질은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)에 2 mM 농도로 용해하였음. 기질 200 μ l와 효소 50 μ l와 혼합한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였음. 410 nm sepectrophotometer에서 p-nitrophenol이 방출된 양을 측정하였음. 효소활성의 1 unit은 1분당 기질로부터 1umol p-nitrophenol의 양으로 하였음.

(3) 주사전자현미경(SEM)을 통한 균주 관찰

(가) 생물전환 분리 미생물의 형태학적 특성을 관찰하기 위해 주사전자현미경을 이용하였음. 균주를 한천배지에 배양시킨 후 배지를 적당한 크기로 자른 후 2.5 % glutaraldehyde를 이용하여 샘플을 하루 동안 담가 주어 세포를 고정시켜주었음. 1 % osmium tetroxide를 이용하여 30분 동안 방치하여 2차 고정을 하였음. 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100 % ethanol로 단계적으로 탈수를 시켜준 후 isoamlyacetate로 알콜을 치환시켜준 후 건조를 하였음. 이것을 코팅하여 주사전자현미경을 이용하여 세포를 관찰하였음.

(4) 분리균주의 flavonoid glycosides의 전환

(가) 분리균주가 다른 flavonoid glycoside에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 keampferol-o-3-rutinoside와 hesperidin, naringin을 사용하였음. keampferol-o-3-rutinoside와 hesperidin naringin을 DMSO에 용해 시킨 뒤 1 mM의 농도로 배지에 첨가 한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 뒤 HPLC 분석으로 전환 유무를 확인하였음.

라. 전환 결과

(1) 백장미 추출물의 주요 성분의 생물전환 미생물 분리

(가) 백장미 추출물의 주요성분인 rutin과 gallic acid를 각각 quercetin과 pyrogallol로 전환시키는 균주를 선별하기 위해 선택배지와 RAPD PCR 방법을 이용하여 균주를 선별하였으며 rutin을 querectin으로 전환시키는 균주는 *E. hirae*로 동정되었고 (Fig. 96) 이 균주의 사진은 Fig. 97과 같음. gallic acid를 전환시키는 균주는 Fig. 98과 같이 RAPD-PCR로 그룹을 만들어 같은 패턴을 보이는 분류 후 균주를 동정하였음.

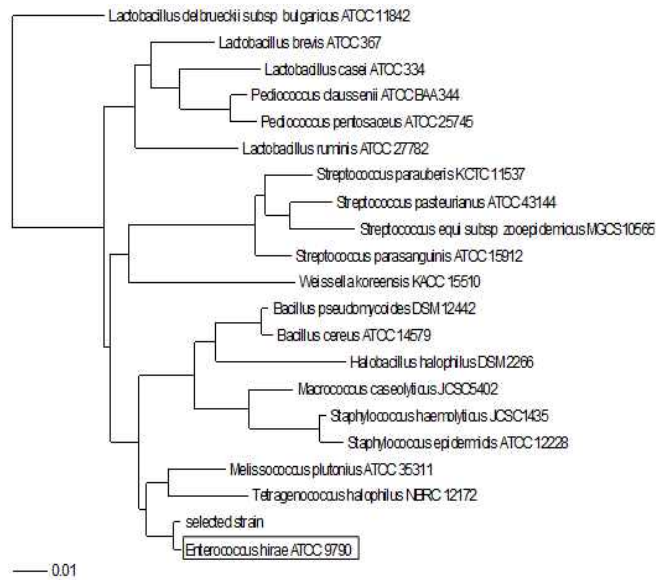


Fig 96. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of converting rutin to quercetin

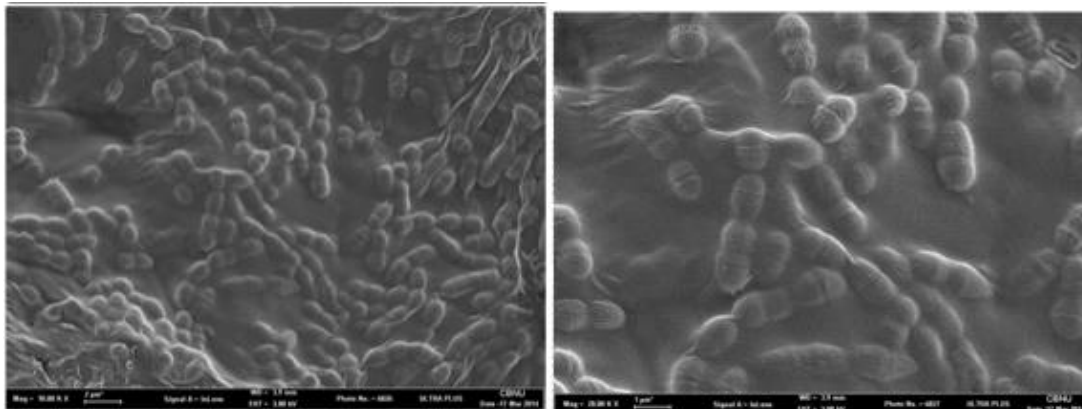


Fig 97. Scanning Electron Micrograph (SEM) of aerial spore chains of *Enterococcus hirae* EFEL009, cultured 1 day at 37 °C on BHI medium.

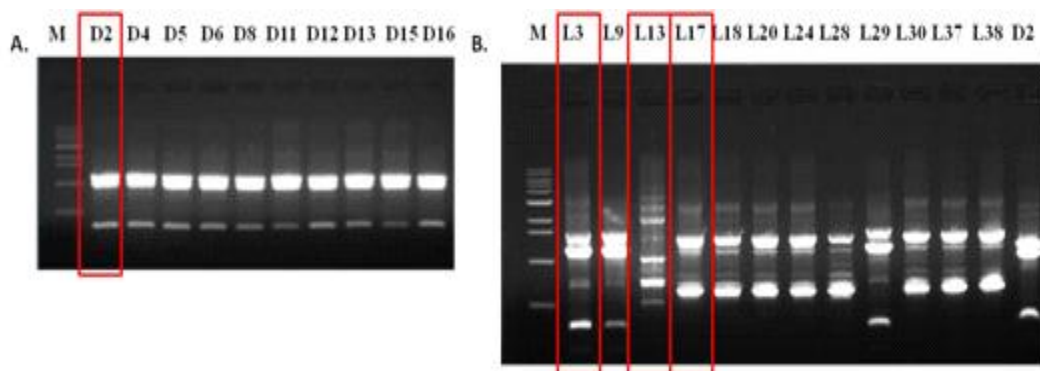


Fig 98. Agarose gel electrophoresis result after RAPD-PCR amplification on screened

single pure colonies from A. DHL, B. LBS selective media that have capability of bioconversion of pyrogallol from gallic acid.

A. Lane M, DNA size marker; Lane D2, D4, D5, D6, D8, D11, D12, D13, D15, and D16 are single pure isolates from DHL selective media

B. Lane M, DNA size marker; Lane L3, L9, L13, L17, L18, L20, L24, L28, L29, L30, and L38 are single isolates from LBS selective media, Lane D2 control.

(나) 선택배지에서 선발된 다양한 균주를 같은 균주의 분류를 위해 RAPD PCR 방법을 이용하여 선발하였으며, Agarose gel 밴드의 형태에 따라서 같은 균주 (Group)로 간주한다. L3/L13/L17 균주는 서로 다른 밴드 형태를 보이며, 다음과 같은 방법을 토대로 총 7가지 균주를 선발하였음. 이후 16s RNA 유전자를 이용하여 각각의 균주를 동정하였음. 그 결과 rutin을 quercetin으로 전환시키는 균주는 *E. hirae* 으로, gallic acid를 pyrogallol로 전환시키는 균주는 *E. faecium* 으로 동정되었음.

Table 24. Screening analysis of isolation of bioconversion capable bacteria from human intestine using 16S rRNA gene sequence.

Sampl	Identified strains	Query%cover	Identity	Accession
D2	<i>Enterococcus durans</i>	100	100	KF149369.1
L3	<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	KC478514.1
L17	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	100	KF154976.1
P1	<i>Enterococcus durans</i>	100	100	KF149369.1
P2	<i>Enterococcus raffinosus</i>	100	100	FN600541.1
P10	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	100	KF154976.1
P22	<i>Enterococcus pseudavium</i>	100	100	KC699158.1

(2) 생물 전환 미생물의 분석

(가) 선발된 균주의 전환패턴을 분석한 결과, Fig 99와 같이 *E. hirae*는 rutin을 isoquercetin으로 전환한 후 quercetin으로 전환하였음. *E. faecium*은 Fig. 100과 같이 gallic acid를 pyrogallol로 전환하였음.

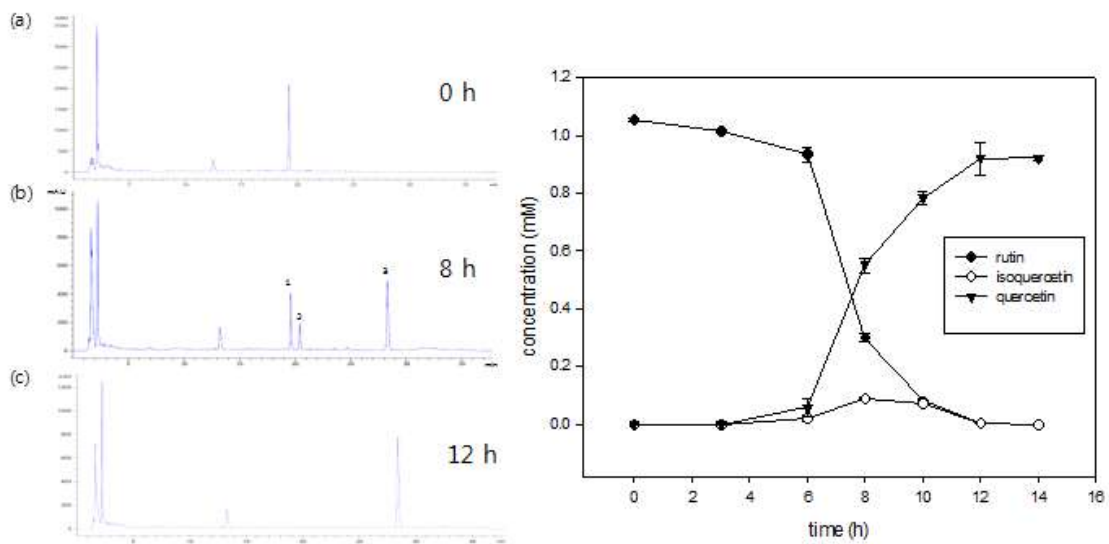


Fig 99. Time course of rutin degradation by *E. hirae*. The initial concentration of rutin was 1 mM. The concentrations of rutin(●), isoquercetin(○), and quercetin(▲) in the supernant are shown.

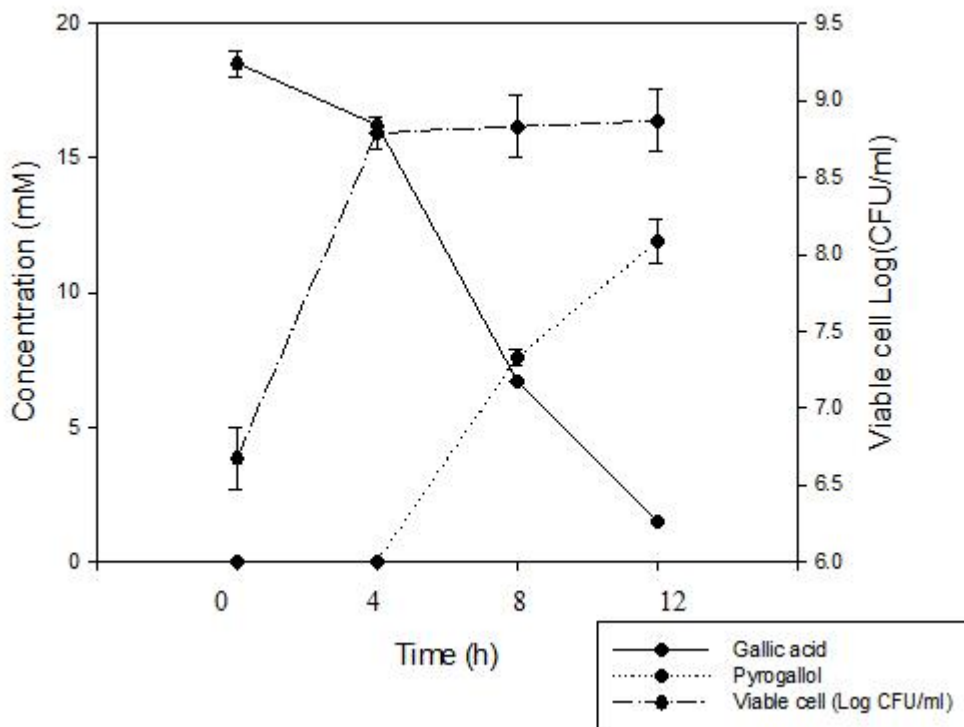


Fig 100. Bioconversion yields of pyrogallol from gallic acid by human intestinal isolate *Enterococcus faecium*.

(3) 분리 균주의 효소 활성 측정

(가) rutin을 전환시키는데 관여하는 효소인 β -glucosidase와 α -rhamnosidase의 활성을 측정하였음. β -glucosidase는 rutin과 관계없이 효소활성이 비슷하게 나타난 반면, α -rhamnosidase는 rutin으로 induction시킬 때 전체세포 활성을 기준으로 활성이 약 120배 정도 높게 나타났음 (Table 25).

Table 25. β -glucosidase and α -rhamnosidase activity of selected stain in whole-cell concentrates and cell-free extract.

	glucosidase (U/ml)		rhamnosidase (U/ml)	
	control	rutin	control	rutin
Whole cell activity	21.4	10.3	0.5	60.7
Cell-free extract activity	0.1	0.3	0.2	20.1

One unit of enzyme activity was defined as the amount of β -glucosidase and α -rhamnosidase that released 1 μ mol of *p*-nitrophenol from the substrate per min

(4) 분리균주의 flavonoid glycosides의 전환

(가) rutin을 전환시키는 *E. hirae*가 다른 종류의 flavonoid glycosides의 전환 유무를 조사하였음. Table 29과 같이 *E. hirae*는 keampferol-*o*-3-rutinoside는 keampferol로 전환하였지만 hesperidin과 naringin은 전환하지 못하였음.

Table 26. Bioconversion of rutin, keampferol-*o*-3-rutinoside, hesperidin and naringin respectively by selected strain.

Substrate	0 h	24 h
Rutin	+	-
Keampferol- <i>o</i> -rutinoside	+	-
Hesperidin	+	+
Naringin	+	+

+, detection ; -, not detection

마. 공시 균주를 이용한 백장미 추출물 유래 phytochemical의 생물 전환

(1) *in silico* 분석을 이용하여 균주 선발

(가) 백장미 추출물의 주요성분인 gallic acid를 pyrogallol로 전환시키는 phenolic acid decarboxylase (PAD) 유전자를 가지는 공시균주 선발하기 위해서 KEGG, NCBI, BioCYC, IMG유전자 Database를 이용하였음. 그 결과, 총 20 개 유산균 균주 검색되었고, 그 중 분양 및 배양이 가능한 균주 10개를 확보한 후 실험에 이용하였음.

Table 27. Main LAB species having pheniluc acid decarboxylase (PAD)

LAB species	PAD
<i>Enterococcus faecium</i>	+
<i>Enterococcus hirae</i>	+
<i>Enterococcus mundii</i>	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	+
<i>Lactobacillus buchneri</i>	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	+
<i>Lactobacillus curvatus</i>	+
<i>Lactobacillus eqicursoris</i>	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+
<i>Lactobacillus florum</i>	+
<i>Lactobacillus heveticus</i>	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	+
<i>Lactobacillus mali</i>	-
<i>Lactobacillus murinus</i>	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>askei</i>	+
<i>Lactobacillus ultunesis</i>	+
<i>Lactococcus garvieae</i>	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+

(2) 공시 균주의 phenolic acid decarboxylase (PAD) 활성 측정

(가) *in silico* 분석 통해 PAD 유전자를 가지는 공시 균주의 생물 전환 효소 활성 유무를 확인하기 위해, gallic acid (1 mM)가 첨가된 MRS broth에 각 공시 균주를 접종한 후 37 °C, 0/6/12 시간 동안 배양 후 HPLC로 분석하여 pyrogallol로 생물 전환 유무를 분석하였음. 그 결과, gallic acid는 3 균주에서 pyrogallol로 전환하였음. 그 중 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104 균주가 PAD 활성이 가장 높게 측정되어 백장미 생물 전환 균주로 선정하였음.

Table 28. HPLC analysis condition for polyphenols

HPLC	Agilent 1260 Infinity
Column	ZORBAX SB-C18
Mobile phase	A : water/85 % <i>o</i> -phosphoric acid(99.5/0.5 v/v) B : acetonitrile/water/85 % <i>o</i> -phosphoric acid (50/49.5/0.5 v/v/v)
Gradient	Time (min)
	0.0
	5.0
	33.0
	33.1
Run time	38 min
Injection volume	25 μ l
Wave length	255 nm
Flow rate	1 ml/min
Column temperature	22 $^{\circ}$ C

Table 29. Concentration of gallic acid and pyrogallol in MRS medium supplemented with 1 mM gallic acid for the period of fermentation with LAB.

Fermentation time (h)	Gallic acid (mM)		Pyrogallol (mM)	
	6	12	6	12
<i>Enterococcus hirae</i> EFEL009	0.71	0.13	nd	0.65
<i>Enterococcus faecium</i> EFEL006	0.79	0.77	nd	nd
<i>Lactobacillus casei</i> KCTC 3109	0.82	0.77	nd	nd
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3164	0.76	0.76	nd	nd
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3594	0.76	0.76	nd	nd
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	0.13	0.02	0.65	1.03
<i>Lactobacillus curvatus</i> KCTC 3767	0.81	0.75	nd	nd
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	0.70	0.70	0.06	0.10
<i>Lactococcus lactis</i> sub. <i>lactis</i> IL1403	0.08	0.02	0.47	0.62

nd= Not detected-not determined

마. 유산균을 이용한 백장미 추출물의 주요 성분의 생물 전환

(1) 유산균을 이용한 백장미 추출물의 주요 성분의 생물 전환 확인

(가) 백장미 추출물의 주요 phytochemical 성분인 gallic acid 의 생물전환을 확인하고자, gallic acid (1mM)가 첨가된 MRS broth에 높은 PAD 활성이 *Lb. plantarum* KCTC 3104 균주를 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C, 0/6/12/24 시간 동안 배양한 후 HPLC로 분석하여 pyrogallol로 생물 전환을 확인하였음. 그 결과, *Lb. plantarum* KCTC 3104 균주는 12시간 동안 gallic acid를 대부분 이용하여 pyrogallol로 전환되어 gallic

acid의 생물 전환을 확인하였음. 배양 12시간 이후에 gallic acid의 양은 변화가 없으나, pyrogallol의 양은 감소하는 경향을 보였음.

Table 30. Contents of gallic acid and pyrogallol (mM) after fermentation by *Lb. plantarum* KCTC 3104.

Time (h)	Gallic acid				Pyrogallol			
	0	6	12	24	0	6	12	24
Concentration (mM)	0.90	0.13	0.02	0.02	-	0.54	0.86	0.68

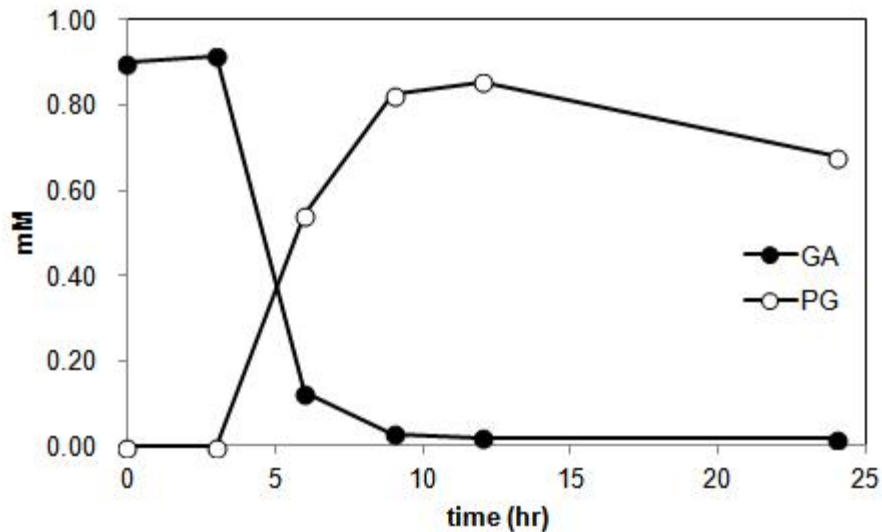


Fig 101. Time course of gallic acid bioconversion by *Lb. plantarum* KCTC 3104. The initial concentration of gallic acid was 1 mM. The concentrations of gallic acid (●) and pyrogallol (○) in the supernatant are shown.

(2) 선정 유산균을 이용한 백장미 추출물의 생물전환

(가) 유산균을 이용하여 백장미 추출물 생물 전환을 하고자, gallic acid (50 mg/ml)가 첨가된 MRS broth에 *Lb. plantarum* KCTC 3104 균주를 접종하고 1N NaOH를 이용하여 배지 pH를 6.5로 조정하여 37 °C, 0/12 시간 동안 배양하였음. 배양을 마친 후 배양액을 HPLC로 분석하여 백장미 추출물의 생물 전환을 확인하였음. 그 결과, 12 시간 동안 배양하였을 때 백장미 추출물의 gallic acid는 pyrogallol로 전환되는 것을 확인하였으며, 전환율은 약 75.25 %임..

Table 31. Contents of gallic acid and pyrogallol (mM) in white rose extract after fermentation by *Lb. plantarum* KCTC 3104

Time (h)	Gallic acid		Pyrogallol	
	0	12	0	12
Concentration (mM)	5.98	1.26	nd	5.76

nd = non-detected

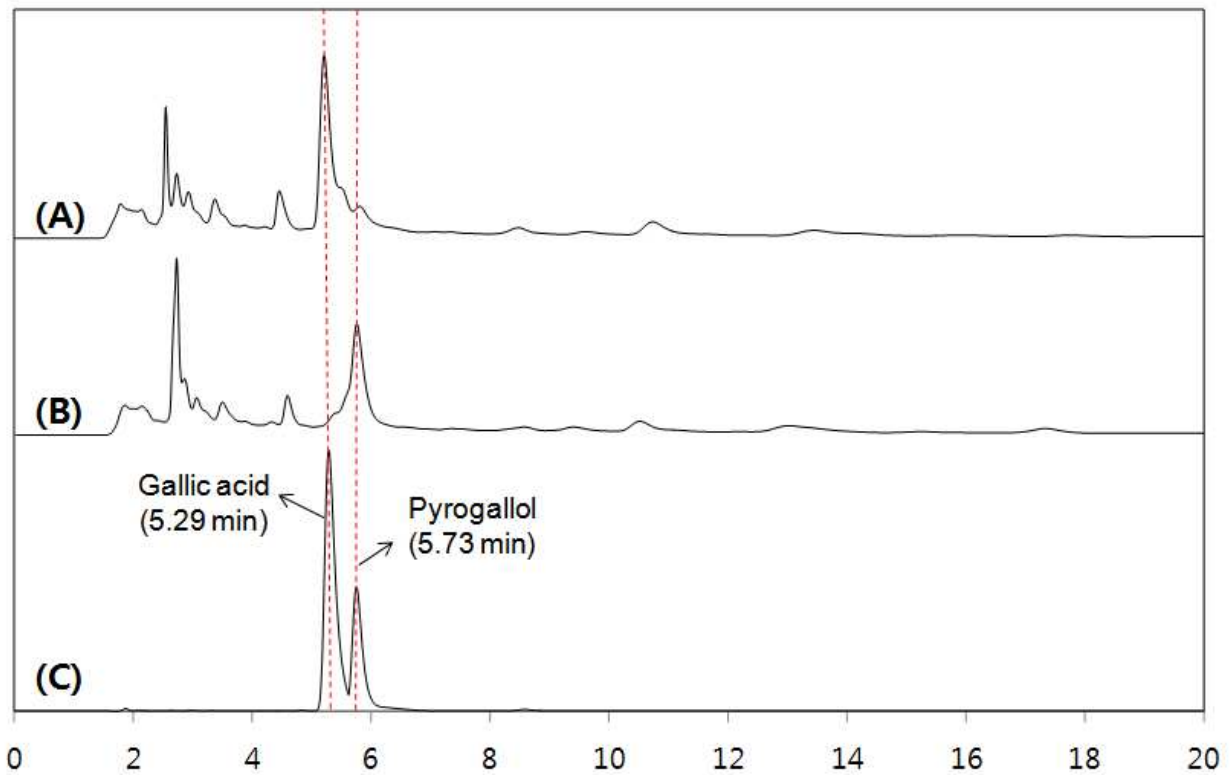


Fig 102. HPLC profile of white rose extract fermented by *Lb. plantarum* KCTC 3104 in MRS medium after 0 (A), 12 (B) hours and standard compounds (C)

2. 백장미 추출물의 장내 미생물의 미치는 영향

가. 백장미 추출물의 주요 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가

(1) *in vitro* digestion method를 이용한 백장미 추출물 유래 phytochemical의 난소화성 확인

(가) 백장미 추출물을 섭취 시, 백장미 추출물 유래 phytochemical이 각 인체 소화기관에서 분비되는 소화 조건에서 변하지 않고 대장까지 도달 여부를 조사하고자, *in vivo* date를 기반으로 인체 소화액을 모사한 Simulated Salivary Fluid (SSF, pH 7.0), Simulated Gastric Fluid (SGF pH 3.0), Simulated Intestinal Fluid (SIF, pH 7.0)

제조한 후, gallic acid, pyrogallol, 그리고 백장미 추출물 (gallic acid)와 각각 3분, 2시간, 2시간 동안 1:1 (v/v) 비율로 반응시킴. 그 결과, gallic acid를 각각의 소화액과 반응시킨 후, 초기 농도값과 비교하여 99.49, 99.34, 98.43 % 회수율을 보였음. pyrogallol은 초기 농도값과 비교하여 99.81, 98.31, 94.83 % 회수율을 보였음. 백장미 추출물을 각 소화액과 반응시킨 후 주요 성분인 gallic acid를 정량한 결과, 초기 농도값과 비교하여 98.70, 98.90, 97.25 % 회수율을 보이며 인체 소화 조건에서 안정적인 물질임을 확인하였음.

Table 32. Recommended concentration of electrolytes in Simulated Salivary Fluid (SSF), Simulated Gastric Fluid (SGF) and Simulated Intestinal Fluid (SIF), based on human *in vivo* data.

Constituent	SSF	SGF	SIF
	Concentration (mM)		
K ⁺	18.8	7.8	7.6
Na ⁺	13.6	72.2	123.4
Cl ⁻	19.5	70.2	55.5
H ₂ PO ₄	3.7	0.9	0.8
HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	13.7	25.5	85
Mg ²⁺	0.15	0.1	0.33
NH ⁴⁺	0.12	1	-
Ca ²⁺	1.5	0.15	0.6

Table 33. Simulated Salivary Fluid (SSF), Simulated Gastric Fluid (SGF) and Simulated Intestinal Fluid (SIF)

Gallic acid			
	Before digestion (mM)	After digestion (mM)	Percentage of recovery (%)
Oral phase	15.53 ± 0.13 ^a	15.45 ± 0.21 ^a	99.49 ^a
Gastric phase	14.36 ± 0.34 ^a	14.27 ± 0.58 ^a	99.34 ^a
Intestinal phase	13.77 ± 0.30 ^a	13.55 ± 0.33 ^a	98.43 ^a
Pyrogallol			
	Before digestion (mM)	After digestion (mM)	Percentage of recovery (%)
Oral phase	19.24 ± 0.33 ^a	19.21 ± 0.29 ^a	99.81 ^a
Gastric phase	21.05 ± 0.66 ^a	20.69 ± 0.33 ^a	98.31 ^a
Intestinal phase	19.63 ± 0.33 ^a	18.62 ± 0.14 ^a	94.83 ^a
Gallic acid (in white rose extract)			
	Before digestion	After digestion	Percentage of

	(mM)	(mM)	recovery (%)
Oral phase	0.51 ± 0.00 ^a	0.50 ± 0.01 ^a	98.70 ^a
Gastric phase	0.42 ± 0.01 ^a	0.41 ± 0.01 ^a	98.90 ^a
Intestinal phase	1.19 ± 0.04 ^a	1.15 ± 0.02 ^a	97.25 ^a

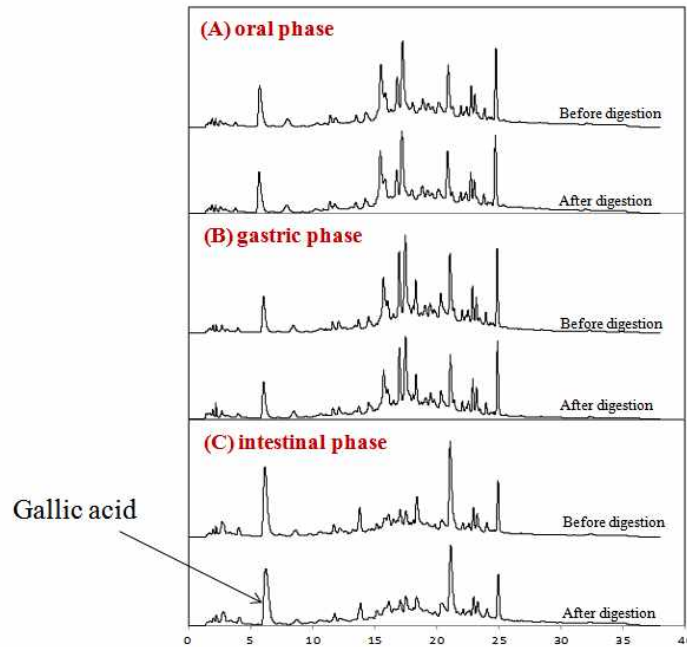


Fig 103. Overlaid chromatograms of white rose extract digested in (A) SSF, (B) SGF, and (C) SIF analysed by high-performance liquid chromatography.

(2) *in vitro* 실험에 이용할 장내 미생물 공시 균주 확보

(가) 백장미 추출물의 기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 분양 및 배양하고 *in vitro* 실험에 안전하게 사용할 수 있는 균주를 확보하였음. 확보한 균주를 총 26 개이며 유산균은 12개, 장내 미생물은 14개 확보하였음.

Table 34. List of lactic acid bacteria and human intestinal bacteria tested in this study

Lactic acid bacteria	Strains	Human intestinal bacteria	Strains
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC 11739	<i>Bacteroides coprocola</i>	KCTC 5443
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	ATCC 33620	<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC 23272	<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8482
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 33694
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	ATCC 53103	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124
<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	ATCC 19435	<i>Clostridium butyricum</i>	ATCC 19398

lactis

<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 8293	<i>Clostridium difficile</i>	ATCC 9689
<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC 15700	<i>Clostridium ramosum</i>	ATCC 25582
<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC 15697	<i>Straphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC 29521	<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC 19258	<i>Ruminococcus gnavus</i>	KCTC 5920

(3) 백장미 추출물의 주요 성분의 장내 미생물 prebiotics 효과 분석

(가) 백장미 추출물의 주요성분인 gallic acid의 장내 미생물에 prebiotics 효과를 분석하고자, gallic acid (1 mM)가 첨가된 MRS broth에 장내 미생물 중 유산균 9개 균주를 각각 접종한 후, 37 °C, 0/24 시간 동안 배양 후 MRS plate에 각 배양액을 도말하여 생균수를 측정하였음. 그 결과, 대조군과 비교하였을 때 gallic acid는 대부분의 *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. 균주의 성장 증진 효과를 보이며, 특히 *Lactobacillus rhamnosus* GG는 140 %로 가장 높은 증진 효과를 보였음.

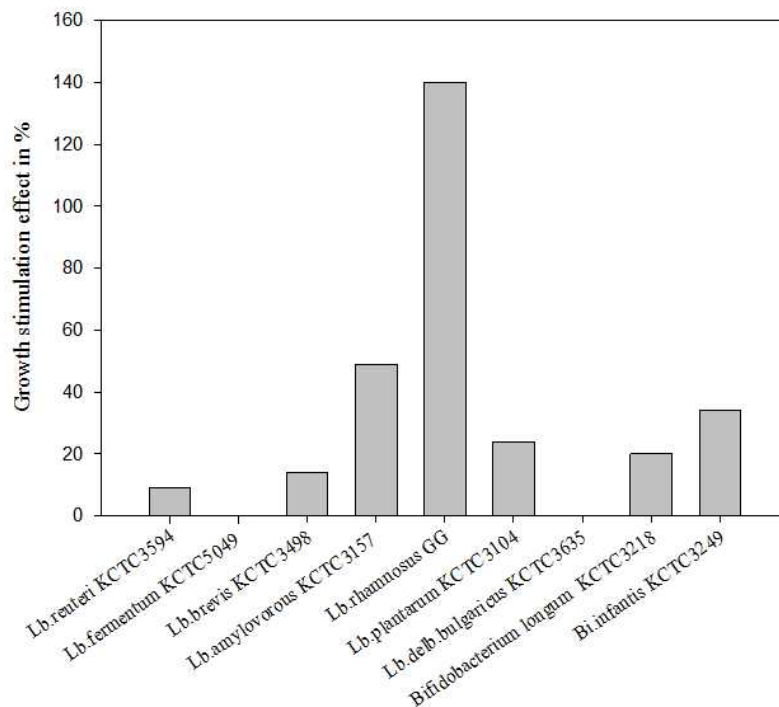


Fig 104. Prebiotic effect of gallic acid (1 mg/ml, w/v) on various lactic acid bacteria after 24 hours of fermentation. The growth stimulatory effect was represented in percentage compare to the control.

Table 35. *in vitro* analysis of prebiotics effect of gallic acid (1 mg/ml) on lactic acid bacteria

Strains	Prebiotic or Stimulatory effect (%) ^a
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	14±1.2
<i>Lb. fermentum</i> KCTC 5049	-
<i>Lb. amylovorus</i> KCTC 3157	49±0.0
<i>Lb. reuteri</i> KCTC 3594	9.2±0.0
<i>Lb. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	140±2.8
<i>Lb. plantarum</i> KCTC 3104	24±0.0
<i>Bifidobacterium breve</i> KCTC 3220	9.5±0.0
<i>Bi. infantis</i> KCTC 3249	34±1.2

^aAll values are X±SE

Prebiotic effects data expressed as growth percentage (%) against control cultures.

(-) Not detected

(4) 장내 미생물에 대한 백장미 추출물 성분의 항균 활성

(가) 백장미 추출물 관련 주요 phytochemical 성분의 항균 활성을 알아보기 위해, 장내 미생물 11개 균주와 gallic acid와 pyrogallol을 각각 배양하여 MIC 분석을 실시하였음. 그 결과, gallic acid는 장내 미생물 11개 균주에 모두 항균 활성 (100 µg/ml < MIC)을 가지며, pyrogallic 또한 항균 활성 (500 µg/ml > MIC)을 가짐.

Table 36. *In vitro* inhibitory or antimicrobial effect of phytochemicals on intestinal bacteria

Strains	Minimum inhibitory concentration (µg/ml) ^a	
	Gallic acid	Pyrogallol
<i>Bacillus cereus</i>	>1000	500
<i>Bacteriodes fragilis</i>	>1000	500
<i>Bac. coprocola</i>	>1000	500
<i>Listeria monocytogenes</i>	1000	500
<i>Salmonella</i> Typhimurium	>1000	500
<i>Bac. vulgatus</i>	>1000	500
<i>Escherichia coli</i>	1000	500
<i>Clostridium perfringens</i>	>1000	500
<i>Cl. butyricum</i>	1000	500
<i>Cl. difficile</i>	>1000	500
<i>Straphylococcus aureus</i>	>1000	500

^a Minimum inhibitory concentration was defined as the lowest concentration that inhibited the growth of bacteria by >90%, compared with the positive control.

(5) 대장 시뮬레이션 발효기 모델을 이용한 백장미 추출물 유래 phytochemical 물질의 prebiotics 효과 분석

(가) 대장 시뮬레이션 발효기 모델을 이용하여 백장미 추출물의 prebiotics 효과를 분석하기 위해, 지난 6개월 동안 대장 관련 질환 및 항생제를 섭취하지 않은 건강한 사람의 분변을 이용하여 대장 발효기 모델에 적용하였음. 발효기에 사용할 배지는 nutrient medium(brain heart infusion 17.5 g/l, peptone 10.0 g/l, sodium chloride 5.0 g/l, disodium phosphate 2.5 g/l)을 이용하였고 혐기조건을 조성하고자 N₂(15 ml/min)을 발효기에 공급하였음. 순환식 항온수조를 이용하여 온도를 37°C로 유지하며, pH 자동조절 펌프를 이용하여 pH 6.8을 유지하였음. 발효는 24시간 동안 진행하였음. 접종원으로 이용할 분변 샘플 (1:10, w/v)은 각각 1 % 접종하였음. 접종원과 기질인 gallic acid(2 mg/ml)과 prebiotic standard로 fructooligosaccharide (FOS, 1 %)를 이용하였음. 샘플(5 ml) 배양 중 4번 (0/6/12/24 시간) 채취하였고 샘플을 이용하여 미생물 및 대사물질 분석을 실시하였음. 미생물 분석을 위해 1ml 샘플을 0.85 % NaCl을 이용하여 단계 희석을 진행한 후 각 선택배지에 도말하여 생균수를 측정하였음. 대사물질인 short chain fatty acid(SCFA)는 HPLC(Younglin, Daejeon, Korea)를 이용하여 정량 분석을 실시하였음.

(6) 장내 미생물에 의한 발효 이후 장내 미생물 조성 변화 및 생성된 대사물질 분석

(가) Gallic acid는 대조군과 비교하였을 때 24시간 배양 후 총 균수의 성장을 증진시켰으며, gallic acid는 유의한 효과를 가진 *Bifidobacterium* sp. 성장을 선택적으로 증진시켰음. Gallic acid는 배양 12시간 후에 *Clostridium* sp.을 감소시켰으며 *Bacteroides* sp.을 약간 증진시켰음. 대사 물질 분석 결과, 장내 미생물은 FOS 뿐만 아니라 gallic acid도 대사하여 SCFA(acetate, butyrate, propionate)를 생성하였음. Gallic acid는 장내 미생물에 의한 propionate 생성을 배양 6시간에서 24시간까지 꾸준히 증가하였으나, acetate는 대조군과 비교하여 생성량이 증가하였으나 6시간 이후 생성을 하지 않았음. 장내 미생물에 의해 대사된 gallic acid와 FOS는 butyrate 생성량을 대폭 증가시켰음.

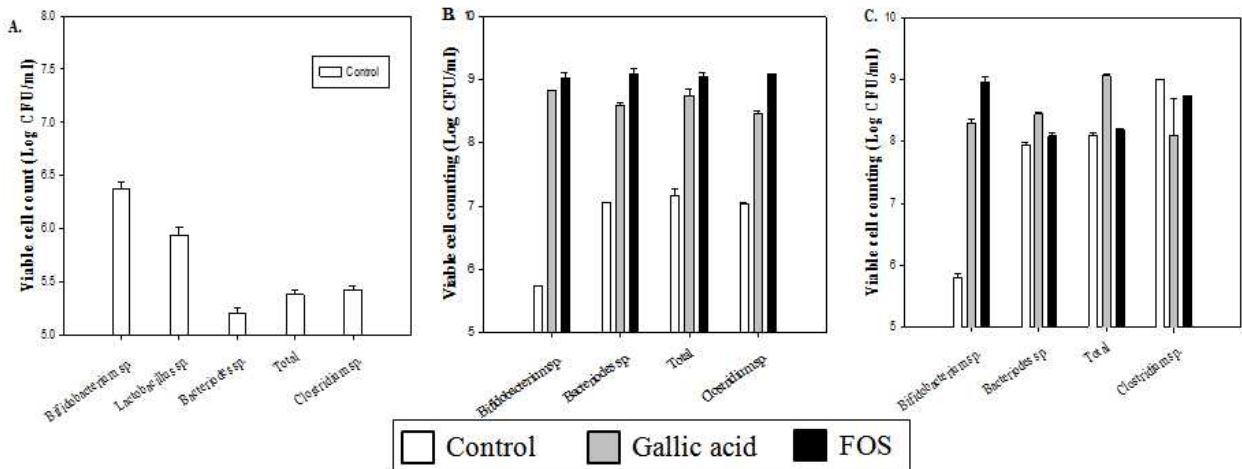


Fig 105. Effect of gallic acid (2 mg/ml) (grey), FOS (1 %, w/v) (black) on the human microbiota in a pH-controlled, stirred, fecal batch in vitro culture system. The samples were collected at 0, 12, and 24 h and analyzed by culture dependant method. Changes in bacterial growth calculated by comparing the number of specific bacterial group in the treatment with the number found in a control group, at the same time point. Values are mean (n=3), with standard deviations represented by vertical bars. Mean value was significantly different from that of the control: $p < 0.05$.

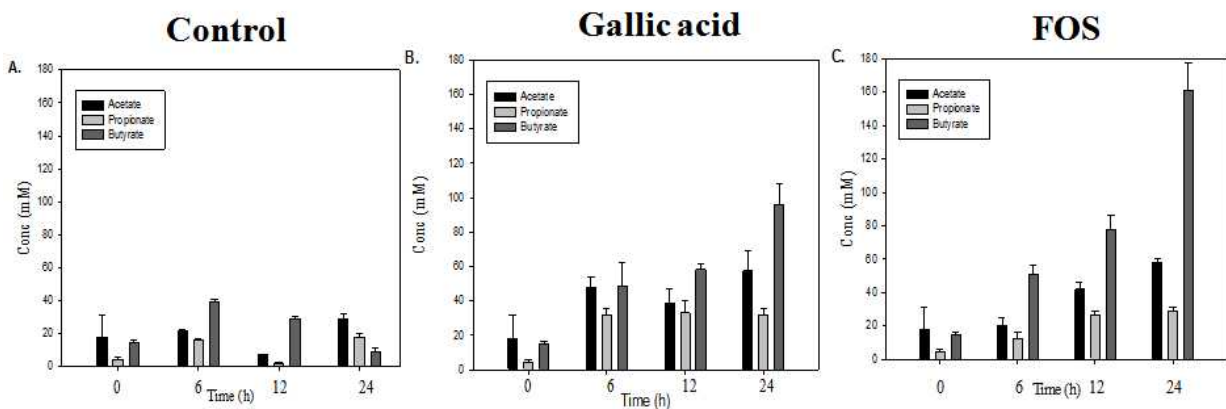


Fig 106. *in vitro* formation of short chain fatty acids, acetic, propionic, butyric acid formed in 24h; from Control (A), gallic acid (2 mg/ml) (B) and FOS (1 %, w/v) (C) by human fecal microbiota. The samples were collected at 0, 6, 12, and 24 h and analyzed by HPLC analysis system. Data were derived from three independent experiments and values are expressed as means \pm SD.

라. 백장미 추출물이 장내 미생물에 미치는 영향 평가

(1) 백장미 추출물에 의한 장내 미생물 prebiotics 효과 분석

(가) 장내 미생물에 대한 백장미 추출물의 prebiotics 효과를 분석하고자, 백장미 추출물 (1, 5, 10, 50 mg/ml)이 첨가된 MRS broth에 장내 미생물 중 유산균 11개 균주를

각각 접종한 후, 37 °C, 0/24 시간 동안 배양 후 MRS plate에 각 배양액을 도말하여 생균수를 측정하였음. 그 결과, 대조군과 비교하였을 때 대부분의 유산균은 백장미 추출물(50 mg/ml)에 의해 저해되었지만, *Lactobacillus fermentum* KCTC 5049는 37.3 % 증진 효과를 보였음. 백장미 추출물 1 mg/ml 포함할 경우, *Lb. rhamnosus* GG은 61.36 % 증진 효과를 보였음. 백장미 추출물 5 mg/ml의 경우, *Lb. plantarum* KCTC 3104가 17.52 % 증진 효과를 보였음. 백장미 추출물 10 mg/ml의 경우, *Lb. rhamnosus* GG 17.63 % 증진 효과를 보였음. *Salmonella* Typhimurium, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*는 농도와 상관없이 백장미 추출물에 의해 저해 효과를 보였음.

Table 37. *in vitro* analysis of white rose extract (50 mg/ml) on lactic acid bacteria

Strains	Stimulatory effect (%)
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	-67.4
<i>Lb. fermentum</i> KCTC 5049	37.3
<i>Lb. amylovorus</i> KCTC 3157	-100.9
<i>Lb. reuteri</i> KCTC 3594	-99.6
<i>Lb. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	-98.6
<i>Lb. plantarum</i> KCTC 3104	-100.8
<i>Bifidobacterium breve</i> KCTC 3220	-99.6
<i>B. infantis</i> KCTC 3249	-97.4
<i>B. bifidum</i> KCTC 3281	-99.1

Prebiotic effects data expressed as growth percentage (%) against control cultures.

Table 38. *in vitro* analysis of white rose extract on lactic acid bacteria

Strains	Prebiotics effect (%)		
	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	-18.73	17.62	-33.60
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	61.36	-12.02	17.63
<i>Salmonella</i> Typhimurium KCTC 2515	-34.76	-60.35	-35.27
<i>Bacteroides fragilis</i> KCTC 3688	-16.76	-55.01	-31.99

Prebiotic effects data expressed as growth percentage (%) against control cultures

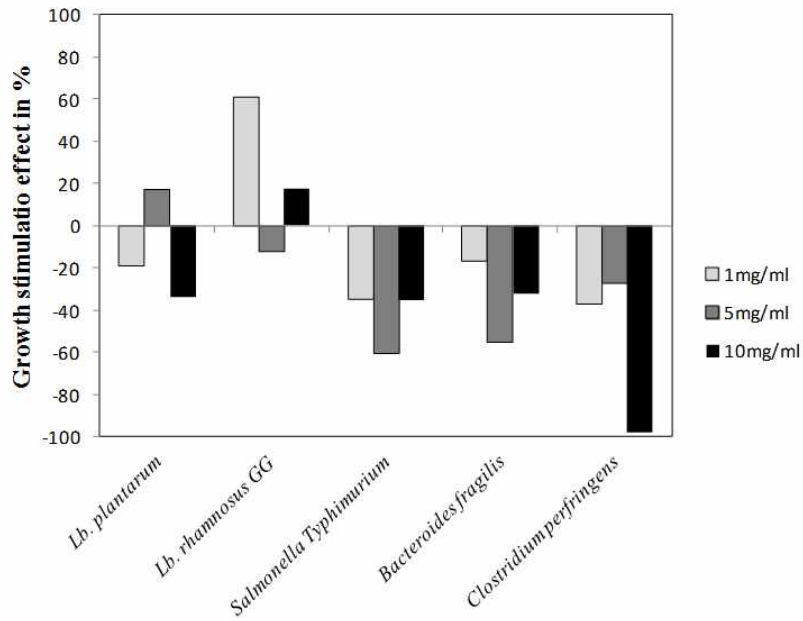


Fig 107. Prebiotic or inhibitory effect of white rose extract (1, 5, 10 mg/ml, w/v) on various lactic acid bacteria after 24 hours of fermentation in MRS broth. The growth stimulatory effect was represented in percentage compare to the control.

(2) 대장 시뮬레이션 발효기 모델을 이용한 백장미 추출물의 prebiotics 효과 분석

(가) 백장미 추출물을 이용하여 발효 이후 장내 미생물 조성 변화와 미생물 변화에 따른 생성된 short chain fatty acid 분석을 실시하고자, 지난 6개월 동안 대장 관련 질환 및 항생제를 섭취하지 않은 건강한 사람의 분변을 이용하여 대장 발효기 모델에 적용하였음. 발효기에 사용할 배지는 basal medium(glucose 1 g/l, peptone water 2 g/l, yeast extract 2 g/l, NaCl 0.1 g/l, K₂HPO₄ 0.04 g/l, KH₂PO₄ 0.04 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.01 g/l, CaCl₂·6H₂O 0.01 g/l, NaHCO₃ 2.0 g/l, Tween 80 2 ml, haemin 0.05 g/l, vitamin K1 10 ml, cysteine.HCl 0.5 g/l, bile salts 0.5 g/l)을 이용하고 혐기조건을 조성하고자 N₂(15 ml/min)을 발효기에 지속적으로 공급하였음. 순환식 항온수조를 이용하여 온도를 37 °C로 유지하며, pH 자동조절 펌프를 이용하여 pH 6.8을 유지하였다. 발효는 24시간 동안 진행하였음. 접종원으로 이용할 분변 샘플(1:10, w/v)은 각각 1 % 접종하였다. 접종원과 함께 기질인 백장미 추출물(WRE, 5 mg/ml)과 prebiotic standard로 fructooligosaccharide(FOS, 1 %)를 이용하였다. 샘플(5 ml) 배양 중 3번(0/12/24 시간) 채취하였고 샘플을 이용하여 미생물 및 대사물질 분석을 실시하였음. 미생물 분석을 위해 1 ml 샘플을 0.85 % NaCl을 이용하여 단계 희석을 진행한 후 각 선택배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. 대사물질인 short chain fatty acid(SCFA)는 HPLC(Younglin, Daejeon, Korea)를 이용하여 정량 분석을 실시하였음.

(3) 발효 이후 장내 미생물 조성 변화 및 생성된 short chain fatty acid 분석

(가) 백장미 추출물은 12시간 이후에 *Lactobacillus* sp. 미생물 생균 수준을 유지시키며, 대조군과 비교하였을 때 배양 24시간 후에 *Lactobacillus* sp.의 성장을 증진시켰음. 백장미 추출물은 대조군과 비교하였을 때 총 균수, *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp. 생균수의 차이를 보이지 않았음. 대사물질 분석 결과, 백장미 추출물과 FOS는 장내 미생물에 의해 대사되어 SCFA 생성하였음. 백장미 추출물은 대조군과 비교하였을 때 총 유기산 함량 생성을 증가시켰음. 배양 12시간부터 lactate 생성량을 증가시켰으며 24시간 최종 lactate 양은 대조군의 4배로 생성량이 증가된 것을 확인하였음. 백장미 추출물을 이용하여 장내 미생물에 의해 생성된 acetate와 butyrate 생성량은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으며, propionate는 전혀 생성되지 않았음.

Table 39. Bacterial population changes in pH-controlled, stirred fecal batch cultures at 0, 12, 24 h using white rose extract (WRE) and fructooligosaccharides (FOS)

Substrate	Time (h)	Total bacteria	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Bacteroides</i> sp.
Control	0	6.39±0.01	4.73±0.09	5.07±0.22	6.00±0.16	5.56±0.17
	12	8.55±0.01	6.99±0.01	7.74±0.11	8.51±0.04	8.45±0.08
	24	8.30±0.06	5.03±0.35	7.98±0.21	7.90±0.06	8.12±0.17
FOS	0	6.34±0.03	4.70±0.04	5.01±0.22	5.97±0.07	5.97±0.06
	12	8.61±0.08	7.17±0.07	7.79±0.04	8.15±0.06	8.05±0.07
	24	9.03±0.02	5.52±0.16	8.42±0.12	8.07±0.02	8.95±0.01
WRE	0	6.39±0.09	4.79±0.07	5.26±0.18	5.69±0.09	5.76±0.09
	12	8.22±0.07	6.38±0.17	7.67±0.06	8.23±0.22	8.01±0.05
	24	8.40±0.05	6.33±0.35	7.98±0.21	8.48±0.07	8.57±0.44

Data were expressed as Log CFU/mL±SD.

Table 40. Concentrations of acetate, butyrate, lactate, and propionate in pH-controlled, stirred fecal batch culture using white rose extract (WRE) and fructooligosaccharides (FOS)

Substrate	Time (h)	Acetate	Butyrate	Lactate	Propionate	Total SCFAs
Control	0	0.0±0.0	4.2±0.0	2.2±0.0	0.0±0.0	6.4±0.0
	12	7.8±0.1	1.4±0.3	9.1±0.3	0.6±0.5	18.9±0.7
	24	9.9±0.1	10.0±0.1	7.3±0.2	3.1±0.1	30.3±0.1
FOS	0	1.5±0.0	6.0±0.0	4.6±0.0	0.0±0.0	12.1±0.0
	12	38.6±0.2	1.4±0.1	56.2±2.1	8.8±1.0	104.9±0.9
	24	41.7±1.9	11.3±0.0	49.1±0.2	7.6±1.2	109.6±3.0

WRE	0	0.0±0.0	3.3±0.0	2.0±0.0	0.0±0.0	5.3±0.0
	12	2.7±0.2	0.0±0.0	19.7±0.3	0.0±0.0	22.4±0.4
	24	6.7±0.1	8.5±1.2	28.2±2.4	0.0±0.0	43.4±3.7

Data were expressed as mM±SD.

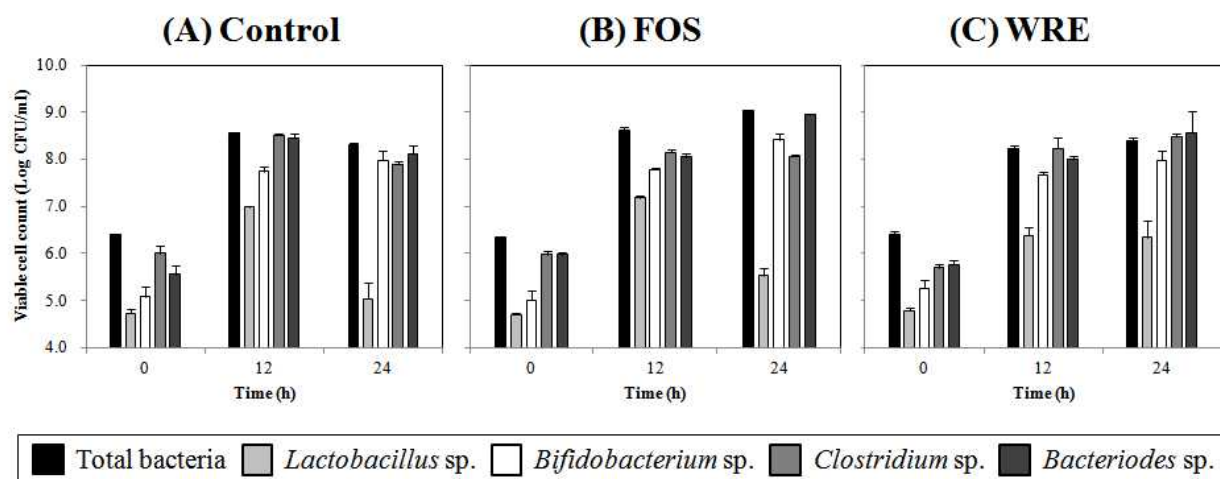


Fig 108. Effect of control (A), FOS (1 %, w/v) (B), white rose extract (5 mg/ml) (C) on the human microbiota in a pH-controlled, stirred, fecal batch *in vitro* culture system. The samples were collected at 0, 12, and 24h and analyzed by culture dependant method. Change in bacterial growth calculated by comparing the number of specific bacterial group in the treatment with the number found in a control group, at the same time point. Values are mean (n=3), with standard deviations represented by vertical bars.

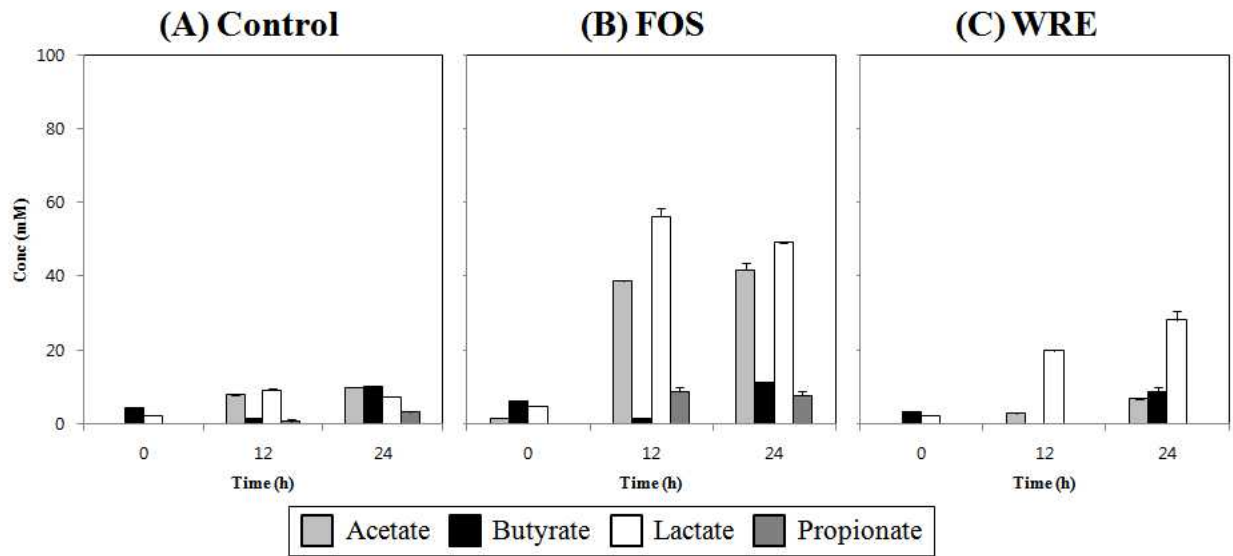


Fig 109. *in vitro* formation of short chain fatty acids, acetate, propionate, butyrate, and lactate formed in 24h; Control (A), FOS (1 %, w/v) (B) and white rose extract (5 mg/ml) (C) by human fecal microbiota. The samples were collected at 0, 12, and 24 h and analyzed by HPLC analysis system. Data were derived from three independent experiments and values are expressed as means \pm SD.

(5) 발효 이후 백장미 추출물의 주요 성분 변화 분석

(가) 대장 시뮬레이션 발효기 모델을 이용하여 백장미 추출물의 주요 성분인 gallic acid의 변화를 분석하고자, 0/12/24시간 재취한 샘플을 HPLC를 이용하여 정량을 실시하였음. 그 결과, 백장미 추출물 유래 gallic acid는 24시간동안 지속적으로 장내 미생물에 의해 이용된 것을 확인하였으며, 백장미 추출물 유래 phytochemical이 장내 미생물 조성 변화와 그에 따른 대사 생성분에 영향을 줄 것으로 사료됨.

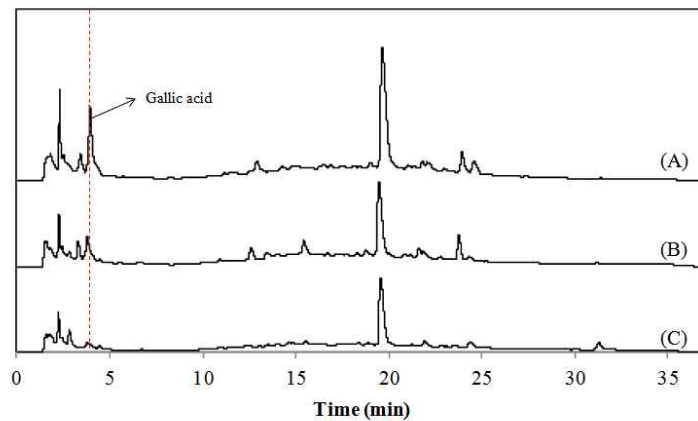


Fig 110. Overlaid chromatograms of gallic acid in white rose extract fermented by human fecal microbiota after 0 (A), 12 (B), and 24 (C) hours analysed by high-performance liquid chromatography.

Table 41. Contents of gallic acid in white rose extract after fermentation by human fecal microbiota

	Time (h)		
	0	12	24
Concentration (mM)	0.70±0.00	0.42±0.21	0.10±0.01

6절 백장미로부터 피부 미용 기능성 성분 추출공정 최적화 및 대량 생산 기술 개발

1. 추출공정 최적화 및 대량 생산 기술개발

가. 진행방법

- (1) 1차 년도 lab-scale 연구결과에 의해 선택된 백장미 추출방법은 에탄올 추출과 열수 추출방법이며, 이를 대량 생산화 공정에 적용하기 위하여 파일럿과 시생산 수준의 추출 장비선정 및 조건 확립을 진행하였음.

나. 대량생산 추출 장비 선정

- (1) 백장미 기능성분의 에탄올 추출공정에는 추출기, 분리기, 농축기, 건조기가 사용되며 원물과 추출물 의 특성과 경제성을 고려하여 적절한 대량생산 장비 선정을 진행하였 음.
- (2) 추출장비는 50 L 소형, 2,000 L 대형 추출기를 사용하여 대량 추출 조건 연구 및 시생 산을 진행하였음.
 - (가) 50 L 소형 추출기는 Pilot scale 생산 시에 이용하였으며, 조건 최적화 연구에 용이 함.
 - (나) 2,000 L 추출기는 대량 추출에 사용하며 최소 용매와 시료가 700 L 이상 필요하며, 조건 최적화 후 대량생산에 사용하였음.
- (3) 원물에서 기능성분의 분리는 정치형 추출기이므로 추출망에 시료를 담아 추출하는 방 식으로 진행하였으며, 원심분리기는 장미 추출 후 장미꽃잎에 의하여 장비가 막힐 위 험이 있으며, Filter press는 추출 후 추출액을 사용함이 목적이므로 추출액 회수에 부 적합하여 사용하지 않았음.
- (4) 에탄올 추출 방법 적용시 추출물에 혼재한 잔류 에탄올의 제거가 필요하고 부피를 감 소시켜 경제적 건조를 진행할 수 있도록 500 kg 용량 농축기 및 20 L 회전 농축기 사 용하였음. 500 kg 용량 농축기는 최종 대량 생산(2,000 L) 시에 추출용매 중 에탄올을 제거하기 위하여 사용하였고, 20 L 회전 농축기는 조건 최적화 연구 중 에탄올 추출 물의 에탄올 제거에 이용하였음
- (5) 추출물의 건조를 위해 동결건조기와 분무건조기를 적용하여 대량생산 연구 진행하였으

며, 분무 건조기는 추출물의 농도에 따라 부형제를 사용하여 건조하였음.

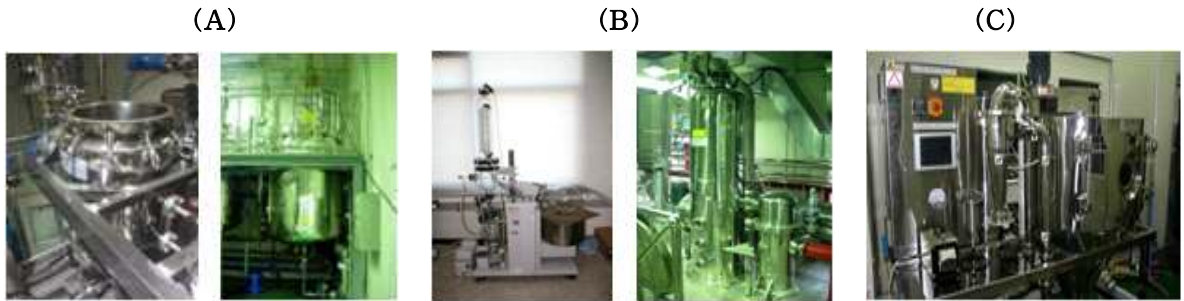


Fig 111. Production equipment for mass production of white rose extracts

A: Extractor, B: Evaporator, C: Spray dryer

다. 대량생산(Pilot scale)추출 방법

- (1) Lab scale의 다양한 추출방법에서 추출물의 폴리페놀 수율과 *in vitro* 실험 결과를 토대로 열수 추출 방법과 에탄올 추출방법을 대량생산 추출방법으로 선택하였고 Lab scale 최적 추출조건을 기준으로 대량생산 추출 조건 적용 진행하였음.
- (2) 대량생산 추출방법 적용시 백장미 꽃잎 가공은 pilot scale 장비의 내부 파이프와 필터의 막힐 위험과 최종 추출물의 불용성 이물질 증가를 방지하기 위해 Lab scale에서 적용하였던 백장미 꽃잎 원물의 14 mesh 분쇄 샘플을 사용하고 얇고 원물 그대로 추출망에 담아 추출하였음.
- (3) Lab scale 추출시 동결건조만을 진행하였으나 경제적인 대량생산 공정의 확립을 위해 동결건조 (freeze dry) 및 분무건조(spray dry) 두 가지 방법을 적용하였음.
- (4) 백장미 꽃잎 건조물 500 g 을 열수 또는 에탄올 41 % 추출용매에 1:25 비율로 침지하여 온도 (50~90 °C), 추출 시간(1~5 hr)따라 고형분 함량, 폴리페놀 추출수율과 지표 성분인 gallic acid 함량을 확인하였음.

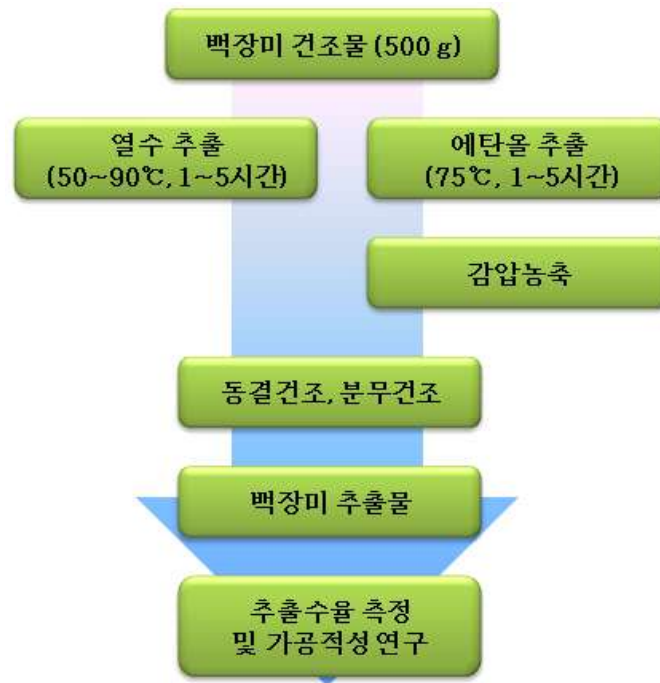


Fig 112. Process drawing for pilot scale extraction of white rose petal

라. 에탄올 추출 공정 최적화

- (1) 1차년 RSM(Response Surface Method) 연구에서 총 폴리페놀 수율이 가장 높았던 추출 용매인 에탄올 농도 41 %, 추출온도 75 °C로 고정하고 추출시간을 변수로 1, 3, 5 시간 조건별 3차례씩 추출을 진행하고 분무건조를 이용하여 건조하였음.
- (2) 백장미꽃잎 원물 대비 얻은 추출물의 건조물 수율은 3차에 진행한 5시간 추출물에서 가장 높았고 총 폴리페놀 수율이 가장 높았던 추출시간 조건은 3시간 244.76(mg GAE / g dry mass)이었음.
- (3) 추출 고형분 및 폴리페놀 수율의 평가 결과는 건조시 사용한 데스트린 제외 순수 추출물에 대한 함량으로 지표성분인 gallic acid 함량은 31,727 mg/kg으로 전체 추출물의 약 3% 정도의 고농도 함유된 폴리페놀 성분이었음.

Table 42. Change of the polyphenol yield according to extract time

구분	1차	2차	3차
추출온도	75 °C	75 °C	75 °C
에탄올 농도	41 %	41 %	41 %
추출시간	1 시간	3 시간	5 시간
추출액고형분 함량	1.96 %	2.04 %	2.25 %
건조물 수율	25.6 %	28 %	31.0 %
성상	암갈색의 분말	암갈색의 분말	암갈색의 분말
폴리페놀 함량 (mg GAE)	238.67	244.76	223.85

/ g dry mass)			
Tyrosinase inhibition (%)	72.49	76.15	76.33
Elastase inhibition (%)	10.76	13.59	13.37
Gallic acid(mg/kg)	31,727 mg/kg		

(4) 에탄올 추출물의 동결건조 및 분무건조 방법에 따른 미백효과(tyrosinase inhibition assay) 비교 동결건조가 분무건조에 비해 다소 tyrosinase inhibition 효과가 높은 것으로 나타났으나, 유의차는 없었음.

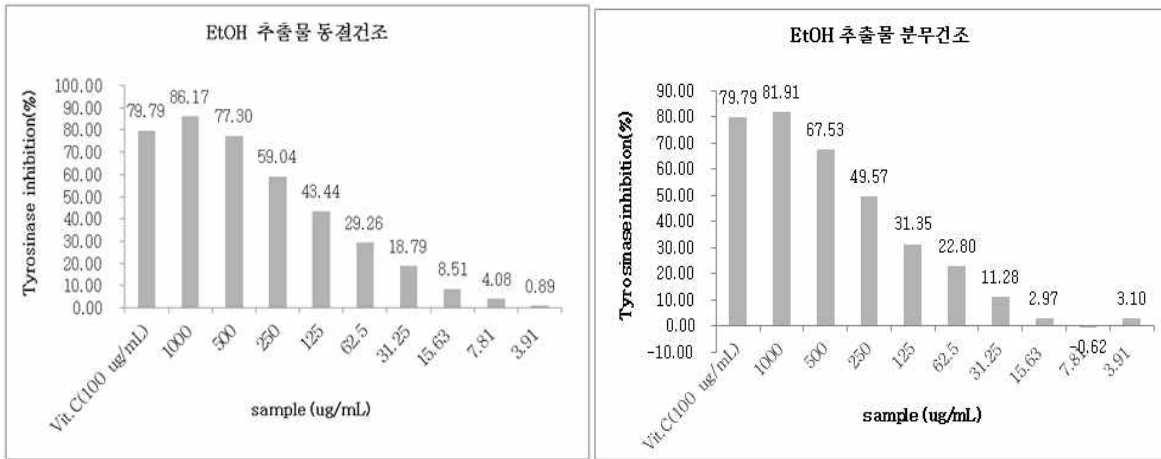


Fig 113. Effects of drying methods on tyrosinase inhibition activity.

마. 열수 추출 공정 최적화

- (1) Lab scale의 최적 조건인 중성 pH로 하고 추출온도 50, 70, 90 °C 조건과 추출시간 1, 3, 5시간 조건별로 추출을 진행한 뒤 분무건조 하였음.
- (2) 추출온도별 추출물의 건조물 수율과 폴리페놀 함량 수율 확인 결과 70 °C에서 원물대 비 건조물 32.2%로 가장 높은 수율을 보였으며, 폴리페놀 함량은 196.83 mg GAE / g dry mass 이었음.
- (3) 추출시간별 추출물의 건조물 수율은 5시간이 32.7% 로 가장 높았으나 3시간의 32.2%와 큰 차이가 없는 반면 폴리페놀 함량수율은 3시간 추출물에서 가장 높게 나타났음.
- (4) 지표성분인 gallic acid 함량은 에탄올 추출물과 유사한 전체 건조물의 약 3% 정도가 함유되어 있는 것으로 나타났음.

Table 43. Change of the polyphenol yield according to extract time and temperature.

구분	1차	2차	3차	4차	5차
추출온도	50 °C	70 °C	70 °C	70 °C	90 °C
추출시간	3 시간	1 시간	3 시간	5 시간	3 시간

추출액 고형분 함량	1.62 %	1.38 %	1.84 %	1.83 %	1.28 %
건조물 수율	24.3 %	24.7 %	32.2 %	32.7 %	22.0 %
성상	아이보리 분말	아이보리색 의 분말	아이보리 색 의 분말	아이보리색 의 분말	아이보리 색 의 분말
폴리페놀 함량 수율 (mg GAE / g dry mass)	174.24	190.63	196.83	180.50	172.50
Tyrosinase inhibition (%)	77.26	77.70	77.82	77.76	76.77
Elastase inhibition (%)	4.80	4.89	5.72	7.50	5.04
Gallic acid(mg/kg)	33,308.60				

(5) 열수 추출물 건조시 부형제를 통한 수율 최적화를 진행하였다. 열수 추출물의 고형분 함량은 2 % 미만으로 건조기 내 부착 및 높은 온도 사용으로 분무건조에 부적합하여 부형제(말토덱스트린)를 사용하여 점도 증진 및 분무건조기 챔버 내 부착 방지를 통한 손실을 최소화 하고자 하였음.

(가) 부형제 농도를 0 %, 2 %, 5 %, 10 %로 증가 시키면서 추출물의 건조후 수율을 확인한 결과 사용 하지 않은 경우 가장 수율이 떨어졌으며, 2 % 부형제 사용에서 가장 높은 건조 수율을 확인 할 수 있었음.

Table 44. Change of the drying content yield according to excipien concentration of hot water extracts. (standard : extracts 4L)

부형제 농도	0 %	2 %	5 %	10 %
부형제 사용량	0 g	80 g	200 g	400 g
엑상 추출물 중 고형분량 +부형제 중 량	51.1 g	131.1 g	251.1 g	451.1 g
건조 후 중량	34.6 g	114.7 g	211.1 g	336.6 g
건조물 수율	67.71 %	87.49 %	84.07 %	74.62 %

바. 생산규모 추출 공정 적용

(1) Pilot scale 최적 공정을 생산규모 추출 공정에 적용하여 실제 생산에 적용가능성평가와 공정별 표준화를 확립하고 전체 공정을 통한 고정비용, 인건비, 원가비용을 산출하여 백장미 꽃잎으로 부터 기능성 원료 생산의 추출 방법에 따른 경제성 평가를 진행 하였음.

(2) 2000 L 추출조에 백장미꽃잎 원물 23 kg과 에탄올 287 kg이 포함된 추출용매 723 kg

가하여 추출조건 75 ℃, 3시간 추출진행하고 추출액을 필터후 감압 농축기(-75cm Hg, 온도 50 ℃)로 농축하여 100 kg 용량 동결건조기로 24시간 동안 동결 건조 진행 하였음.

(3) 백장미꽃잎의 생산규모 기능성분 추출공정은 성공적으로 적용되어 원물대비 건조물 수율 27% 이상과 Lab scale 대비 100% 이상 폴리페놀 함량 수율을 보였음.

<p>1. 백장미 건조물 투입</p>  <p>건조 백장미를 포에 넣어 추출기에 넣어 준비</p>	<p>2. 추출포 고정</p>  <p>추출 중 추출포가 떠오르지 않게 고정</p>	<p>3. 추출기 내부</p>  <p>에탄올과 물을 넣고 75℃에서 3시간동안 추출</p>
<p>4. 추출기 냉각</p>  <p>추출물은 냉각 tank로 옮겨 농축기로 옮기기 전 냉각</p>	<p>5. 에탄올 제거 및 농축</p>  <p>진공압, 50℃에서 에탄올 제거 및 농축</p>	<p>6. 추출물 회수</p>  <p>회수 파이프를 통하여 농축물 회수</p>
<p>7. 고형분 함량 및 당도 조절</p>  <p>농축 추출물에 정제수를 섞어 동결건조에 적절한 당도로 조절</p>	<p>8. 동결건조기 투입</p>  <p>건조기 판에 골고루 추출물을 부어 투입</p>	<p>9. 건조 추출물 회수</p>  <p>건조된 추출물을 긁어내어 회수</p>

Fig 114, Progress of production using mass production equipment.

2. Phytochemical 물질 Bioconversion scale-up 생산

가. Pilot scale Bioconversion 생산

(1) Lab scale의 전환 방법에 따라 gallic acid를 pyrogallol로 전환하는 *Lactobacillus plantarum*, KCTC3104 균주를 이용하여 bioconversion 발효공정에 대한 scale-up 생

산 진행하였음.

- (2) Seed culture 3.3 %를 50 L 발효기내 30 L MRS 배지와 5% 장미 추출물 혼합액에 접종하여 37 °C, 24 hr 본 배양을 실시하였음.
- (3) Scale-up 생산은 대량생산에 적합한 pH 보정제로 암모니아수를 사용하고 lab scale에서 사용하지 않았던 anti-foaming agent로 Adekanol 사용하여 거품발생을 방지하고자 하였음.



Fig 115. Pilot scale fermentation machine for bioconversion.

나. Phytochemical bioconversion 확인

- (1) 유산균 균주에 의한 생물전환 배양을 진행하면서 배양액의 O.D. 값이 증가하여 20시간 후에는 11.58까지 상승하였고, 현미경 확인결과에서도 균주의 확연한 성장을 확인할 수 있었음.

Seed culture(3.7 O.D.) 본 배양 0시간(0 O.D.) 본 배양 10시간(1.4 O.D.) 본 배양 20시간(11.58 O.D.)

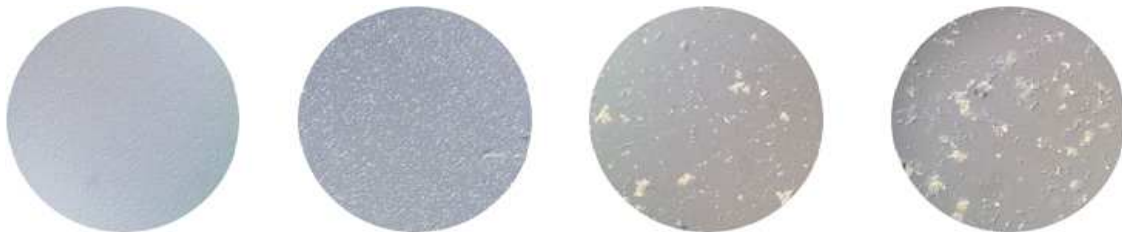


Fig 116. Growth of *LB. plantarum* KCTC 3104 in MRS media.

- (2) 배양 시간별 gallic acid의 pyrogallol 전환율은 HPLC 분석을 통하여 확인하였다.. HPLC 분석결과, 0시간대에서는 gallic acid의 peak만 확인되며 pyrogallol의 peak는 확인되지 않았으나, 24시간 배양 후에는 gallic acid peak은 현저히 낮아진 모습과 함

계 pyrogallol의 peak 확인할 수 있었음..

- (3) 24시간 배양하였을 때, 약 70 %의 전환률을 보여 12시간 배양 lab scale 75.2 5%의 전환률과 유사한 결과를 얻을 수 있었음.

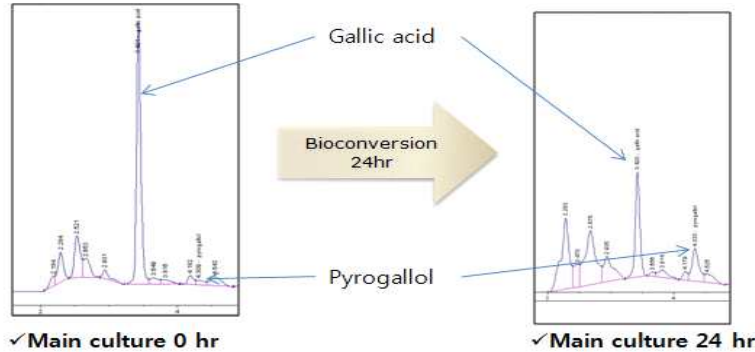


Fig 117. HPLC profile of white rose extract fermented by *Lb. plantarum* KCTC 3104 in MRS medium after 0, 24hours

다. 대량 추출 공정의 표준화

- (1) 에탄올 추출 공정 제조단계에 따른 수율 및 기능성분 함량 변화를 계산하기 위하여 gallic acid 함량 변화 및 건조물 수율을 분석하였음.
- (가) 기능성 후보 식물인 백장미(*Rosa spp.*) 꽃잎을 이용하여 에탄올 추출 대량 생산 공정에서 표준추출분말 제조시 원재료 및 제조공정의 표준화 과정을 통해 건조물의 제조 수율 및 지표성분인 gallic acid의 농축률을 분석하여 아래 표와 같은 결과를 얻었음.
- (나) 원재료 23 kg이 추출시 불용성 물질이 제거되어 37 % 만 추출 되고 농축 및 건조 단계의 손실 발생으로 추출분말의 최종 건조물 수율은 6.41 kg으로 27 %수율을 보였으며, 그 결과 추출분말의 지표성분의 함량은 원재료에 비해 3배 농축되었음을 확인하였음.
- (다) 향후 사업화 시 건조 capacity가 일 1ton 이상의 분무건조 사용하면 추출 수율을 더욱 증가시킬 수 있을 것으로 사료됨.

Table 45. Standardization of production process by ethanol extraction method.

제조공정	세부공정	지표성분 (gallic acid) 함량 변화 (mg/kg)	중량(kg)	건조물 수율 (kg, %)
원재료	백장미 꽃잎 23 kg	8,971	23 kg	23 kg (100%)
추출	열수 413 kg + 에탄올 287 kg(75 °C에서 3 시간 추출)	299	723 kg	8.5 kg (37 %)
농축	-70 cmHg, 50 °C에서 농축	3,945	54.8 kg	7.12 kg (30.9 %)

건조	동결건조기(CUDDON, 100kg)에서 -35℃로 동결 72 시간 건조	30,287	6.41 kg	6.41 kg (27.87 %)
원료				6.41 kg

(2) 열수 추출 공정 제조단계에 따른 수율 및 기능성분 함량 변화를 계산하기 위하여 gallic acid 함량 변화 및 건조물 수율을 분석하였음.

(가) 열수 추출 대량 생산 공정에서 표준추출분말 제조시 원재료 및 제조공정의 표준화 과정을 통해 건조물의 제조 수율 및 지표성분인 gallic acid의 농축률을 분석하여 아래 표와 같은 결과를 얻었음.

(나) 원재료 500 g이 추출시 불용성 물질이 제거되어 36 % 만 추출 되고 건조단계의 손실 발생으로 추출분말의 최종 건조물 수율은 163 g으로 에탄올 추출 방법보다 다소 높은 32.7 %수율을 보임. 이는 공정 중 농축 공정이 없기 때문에 추출물의 공정간 loss가 적기 때문으로 판단되며, 그 결과 추출분말의 지표성분의 함량은 원재료에 비해 3배 농축되었음을 확인하였음.

Table 46. Standardization of production process by hot water extraction method.

제조공정	세부공정	지표성분 (gallic acid) 함량 변화 (mg/kg)	중량(kg)	건조물 수율 (kg, %)
원재료	백장미 꽃잎 500 g	8,971	500 g	500 g (100%)
추출	열수 12.5 kg (75 °C에서 3 시간 추출)	345	13 kg	175.75 kg (36 %)
건조	분무건조기 이용(부형제 말 토텍스트린 2 % 사용)	30,484	163.5 g	163.5 kg (32.7 %)
원료				163.5 g

라. 지표 성분의 범위 설정

- (1) 에탄올 추출물과 열수 추출물의 지표성분인 gallic acid의 범위 설정을 위해 추출 배치별 지표성분 분석을 진행하였음.
- (2) 지표성분 gallic acid 분석을 위해 기존 논문의 분석법을 변형하여 별도의 method validation을 실시하여 사용하였음.
- (3) 배치별 평균 gallic acid 함량은 32,023 mg/kg으로 최소함량 25,618 mg/kg, 최대함량 38,427 mg/kg 범위로 설정하였다.

(가) 최소함량(최소 범위 80 %) : $32,023 \times 0.8 = 25,618$ (mg/kg)

(나) 최대함량(최대 범위 120 %) : $32,023 \times 1.2 = 38,427$ (mg/kg)

Table 47. Analysis by HPLC of index component(gallic acid) according to extraction batch.

배치명	에탄올 75 °C 1 hr	열수 50 °C 3 hr	열수 70 °C 1 hr	열수 70 °C 5 hr	에탄올 75 °C 1 hr
Gallic acid (mg/kg)	31,727	33,309	34,306	30,484	30,287

마. 추출 공정의 경제성 평가

- (1) 대량생산 추출 공정을 통해 3차년 제품 적용을 위한 백장미 꽃잎 추출 소재의 예상 제조원가 및 출고가 평가를 진행하였음.
- (2) 제조원가는 유동비용과 고정비용, 인건비가 포함되고 유동비용 원료비는 백장미 원료 비용 및 추출에 사용되는 에탄올 비용이 해당되고, 유틸리티 비용은 용수 및 보일러 스팀 가동비이임. 고정비용은 생산설비의 감가상각비로 에탄올 추출방법은 추출기설비, 농축기설비, 건조기설비가 포함되고 열수 추출은 농축과정이 없어 농축설비가 제외 되었음.

(가) 유동비용 산출(원료비)

- ① 에탄올 추출에 의한 백장미 추출물 제품 1 kg 제조시 백장미 원료는 1,074,000원, 에탄올 186,557원이 제조비용이 들어가며, 에탄올에 비해 공정상 손실이 적은 열수 추출물은 백장미 원료 918,000원이 소요됨.

표 48. 에탄올 추출물 대량생산 제조비용 산정표

품목	단가	제품 1 kg 제조시 소요 수량(kg)	에탄올 추출물 제조비용(원/kg)	열수 추출물 제조비용
백장미	300,000원/kg	3.58 kg(에탄올) 3.06 kg(열수)	1,074,000	918,000
에탄올	4,167/kg	44.77 kg	186,557	
합계			1,260,557 원/kg	918,000 원/kg

(나) 유동비용 산출(유틸리티비)

① 에탄올 추출에 의한 예상 유틸리티 비용은 31,197원, 열수추출물은 24,623원의 비용이 필요함.

표 49. 열수 추출물 대량생산 제조비용 산정표

품목	단가	제품 1 kg 제조시 소요 수량(kg or hr)	에탄올 추출물 제조비용(원/kg)	열수 추출물 제조비용
용수	1.24원/kg	60.73 kg (에탄올) 76.45 kg(열수)	75.31	94.80
스팀+보일러 가동비 (열수생산)	26,375/hr	1.24 hr(에탄올) 0.93h r(열수)	31,122	24,529
합계			31,197.31 원/kg	24,623.80 원 /kg

(다) 에탄올 추출 대량 생산 시(고정비용)

표 50. 에탄올 추출 대량생산 시 고정비용 산정표

공정	기계명	대수	사양	가격 (천원)	용도	기기가동 시간
추출	추출 T/K	1	Capacity: 2,000 L 전력: 9.6kw	108,799	추출 반응기	180분
농축	농축기	1	Capacity: 500 kg/hr 전력: 14.9 kw	137,500	에탄올 제거 및 농축	240분
건조	동결건조 기	1	Capacity: 100kg 전력: 14kw	200,000	추출물건조	2880분
기계 비용 합				446,299	1batch 감가상각비1)	970,800 원
					설비 도입시1batch 감가상각비2)	366,821 원
					1batch 전기사용량	760.4 kw

(라) 열수 추출 대량 생산 시(고정비용)

표 51. 열수 추출 대량생산 시 고정비용 산정표

공정	기계명	대수	사양	가격 (천원)	용도	기기가동시간
추출	추출 T/K	1	Capacity: 2,000 L 전력: 9.6kw	108,799	추출반응기	180분
건조	동결건조기	1	Capacity: 100 kg 전력: 14 kw	200,000	추출물건조	2880분
기계 비용 합				308,799	1batch 감가상각비	745,200 원
					설비 도입시1batch 감가상각비	253,807 원
					1batch 전기사용량	700.8 kw

(3) 백장미 추출물의 예상 총 제조비용 및 출고가는 다음과 같다.

(가) 에탄올 추출물의 제조원가는 원료비와 유틸리티 비용, 인건비를 포함하여 1,368,480 원으로 산정되었으며, 열수 추출물의 제조원가는 992,996원으로 원료비가 많은 에탄올 추출물에 비해 27 % 저렴하게 산출됨.

(다) 향후 생산 규모 확대와 백장미 원료 수급처의 모색을 통해 총 제조비용의 감소를 추진할 계획임.

표 52. 백장미 추출물 제조 원가 산정표

비용	항목	에탄올 추출물 소재kg당 단가(원/kg)		열수 추출물 소재 kg당 단가 (원/kg)	
유동비용	원료비	1,260,557		918,000	
	유틸리티	31,197.31		24,623.80	
	인건비	19,500		16,622	
고정비용	감가상각비 (설비사용비)	장비대여제조시	설비 도입시	장비대여제조시	설비 도입시
		151,450	57,226	99,096	33,751
제조 원가합계		1,462,704.31	1,368,480.31	1,058,341.80	992,996.80

바. 백장미 추출물 가공적성 평가

(1) 색도 측정

- (가) 식품용 소재에 있어 색도는 맛, 향 등의 관능과 함께 소비자가 식품을 선택함에 있어 중요한 지표로 꼽히는 항목임. 특히, 백장미 추출물의 색상은 갈색을 띠고 있어 음료로 활용 시 탁한 색상을 주어 제품 전체의 색상에 대한 선호도에 영향을 줄 수 있음.
- (나) 색도의 측정은 광학측정 방식의 색도색차계(CM-3500d)를 이용하여 측정하였으며, 추출물은 열수 추출물과 에탄올 추출물을 이용하였음.
- (다) 샘플은 음료 적용 시 미치는 영향을 평가하기 위함이므로 2.5 mg/ml의 농도로 증류수에 희석하여 준비한 뒤, cuvette에 15ml씩 담아 측정. 측정값은 L, a, b 3가지 parameter로 확인하였음.

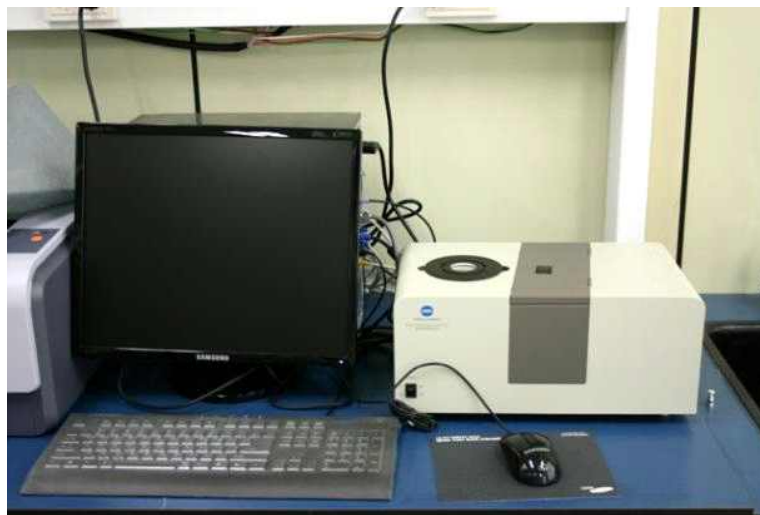


그림118. 코니카 미놀타 CM-3500d

(2) 색도 측정 결과

Table 53. Measurement result of chromaticity according to extract condition.

구분	L*(D65)		a*(D65)		b*(D65)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
에탄올 추출 1시간	89.07	0.89	0.52	0.10	24.09	1.37
에탄올 추출 3시간	86.45	0.11	1.26	0.04	26.41	0.24
에탄올 추출 5시간	87.58	1.39	1.24	0.14	25.49	2.41
열수추출50℃, 3hr	97.27	0.08	-0.86	0.02	10.43	0.20
열수추출70℃, 1hr	96.63	0.07	-0.87	0.02	11.88	0.21
열수추출70℃, 3hr	97.00	0.05	-0.82	0.02	10.62	0.16
열수추출70℃, 5hr	95.66	0.36	-0.85	0.01	14.47	1.17
열수추출90℃, 3hr	96.58	0.16	-0.68	0.02	9.88	0.37

- (가) 색도 색차계 측정에 있어 parameter별 해석은 L^* 은 명도를 나타내며, 값이 커질수록 밝은 색을 뜻하며 값이 작을수록 명도가 낮은 색을 뜻함. a^* 는 적색도를 의미하고, b^* 값은 황색도를 의미함.
- (나) 에탄올 추출물 보다는 열수 추출물이 대체로 높은 명도(L^*)를 나타내며, 에탄올 추출물은 적색(+ a^*)과 노란색(+ b^*)이 높게 측정됨. 열수 추출물 역시 노란색(+ b^*)을 띄나 에탄올 추출물 보다는 낮으며, 붉은색을 약하게 띄는 결과를 보였다(- a^*). 추후 음료 개발에 있어 제품에 미치는 색상을 고려한다면 명도가 높고 전체적 색상이 열게 나타나는 열수 추출물이 에탄올 추출물 보다는 제품 색상에 덜 영향을 미칠 것으로 판단됨.



Fig 119. Compare color of hot water extracts and ethanol extracts.

(3) 용해도 측정

- (가) 에탄올 추출물은 열수 추출과 추출 용매가 상이하기 때문에 추출되는 성분에 차이가 있고, 이 성분들 중 음료개발 시 물에 용해되지 않는 성분이 존재할 수 있음. 본 연구의 최종목적은 백장미 추출물을 활용한 음료 개발이기 때문에 에탄올 추출물의 용해성에 따라 음료 개발에 대한 가공적성에 큰 영향을 줄 수 있어 이를 확인하기 위한 추출물의 용해도 분석을 진행하였음.
- (나) 에탄올 추출물 2 g을 채취하여 정제수 20 ml와 잘 섞어준 뒤 충분히 용해될 시간을 주기 위하여 30 °C수조에서 5분간 정치시켜둔 뒤, 용해된 추출물은 원심분리기를 이용하여 2,000 g에서 10분간 원심 분리하여 용해되지 않은 물질들을 분리함. 상층액은 물에 용해된 성분들이므로 제거해 준 뒤, 용해되지 않고 가라앉은 물질들의 질량을 측정하였음.

Table 54. Water solubility of ethanol extracts.

시료	시료 량	비 수용성 물질	Water solubility(%)
에탄올 추출물 (1시간 추출)	2 g	0.11 g	94.5 %

(다) 에탄올 추출물의 물 용해도는 94.5 % 수준으로 높은 수준이며, 용해되지 않은 비수용성 물질은 수용성 부분과 분리가 용이하므로 음료 적용에 문제가 없는 것으로 사료됨.

(4) 에탄올 추출물의 안전성 평가

(나) 분석은 한국기능식품연구원에 진행하였으며, 주요 검사 항목은 납, 비소, 카드뮴, 수은 중금속 및 농약 58종임.

(다) 분석결과 식품공전상 기준치 이하의 중금속 및 잔류 농약이 검출되어, 에탄올 추출물의 식품소재로 사용에 안전한 것으로 판단됨.

시험항목	결과
납(mg/kg)	0.0299
비소(mg/kg)	0.1575
카드뮴(mg/kg)	0.0038
수은(mg/kg)	0.002
Azoxystrobin(mg/kg)	0.0011
Pyrimethanil(mg/kg)	0.0002
농약56종	불검출

제 D2016050398 호			
검 사 성 적 서			
업체명	WJPE-PD	제조일자 (유통기한)	2016-05-02
의뢰인	업체명 (주)일직물 주소 충청북도 영주시 흥덕구 전단로 124 (충정동) 성명 이순구		
제조번호		검사년월일	2016-05-09
검사의뢰목적	참고용	업체검사번호	D2016050398
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관원 총 책임자:김 현 희			
시험항목	결과	검사담당자	
납(mg/kg)	0.0299mg/kg		류미진
비소(mg/kg)	0.1575mg/kg		류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0038mg/kg		류미진
수은(mg/kg)	0.002mg/kg		조홍
Diazinon(mg/kg)	불검출		김용수
DDT(mg/kg)	불검출		김용수
Dicofol(mg/kg)	불검출		김용수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출		김용수
Malathion(mg/kg)	불검출		김용수
Methomyl(mg/kg)	불검출		이선미
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출		이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출		김용수
Boscalid(mg/kg)	불검출		이선미
BHC(mg/kg)	불검출		김용수
Bifenthrin(mg/kg)	불검출		김용수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출		김용수
Cyprodinil(mg/kg)	불검출		김용수
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출		김용수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출		이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	0.0011mg/kg		이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출		김용수
Ethion(mg/kg)	불검출		김용수
Endosulfan(mg/kg)	불검출		김용수
Imazalil(mg/kg)	불검출		김용수
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출		김용수

그림 120. 백장미 꽃잎 추출물 중금속 및 농약 검사성적서

7절 이너뷰티(Inner Beauty) 기능성 식품개발

1. 백장미 꽃잎 추출물을 이용한 제품 기획 및 개발

가. 제품 기획

(1) 백장미 추출물의 *in vivo*, *in vitro* 연구결과를 바탕으로 하여 항노화 영양음료(주름개선), 아웃도어 프로테인 워터(미백), 소아 아토피 환자용 젤리(아토피 피부염), 갱년기 여성용 두유(보습, 미백, 주름개선) 4가지 형태의 제품으로 개발을 추진하였음.



그림 121. 백장미 꽃잎 추출물을 이용한 기획 제품 4종

(2) 백장미 꽃잎 추출물의 섭취기준 설정

(가) 동물실험에서 사용된 섭취량을 체표면적으로 환산하여 외삽하는 방법으로 제품의 기능성을 담보하기 위한 백장미 추출물의 함량을 결정하였음.

- ① 체표면적은 산소 이용도, 칼로리 소비, 기초 대사량, 혈액량, 혈장 단백질의 순환, 신장 기능 등과 관련성이 높은 지표로 동물실험에 사용된 백장미 추출물의 사용량으로 사람의 섭취량을 환산할 수 있음(Reagan-Shaw S. *et al.*(2008)).
- ② 섭취량은 다음 식에 따라 계산할 수 있음.

$$HED(mg/kg) = Animal\ dose(mg/kg) \times \frac{Animal\ K_m}{Human\ K_m}$$

- ③ 환산 상수는 FDA Draft Guideline에서 제공하는 표를 이용하였으며, 논문(Reagan-Shaw S. *et al.*(2008))의 연구결과를 참고하여 계산하였음.

Table 55. Conversion of animal does to HED based on BSA

Species	Weight(kg)	BSA(m ²)	K _m factor
Human			
Adult	60	1.6	37
Child	20	0.8	25
Baboon	12	0.6	20
Dog	10	0.5	20
Monkey	3	0.24	12
Rabbit	1.8	0.15	12
Guinea pig	0.4	0.05	8
Rat	0.15	0.025	6
Hamster	0.08	0.02	5
Mouse	0.02	0.007	3

자료는 FDA Draft Guideline에 따라 작성되었음.

- ④ 피부기능효과를 얻기 위해 성인(70 kg)이 섭취해야 할 백장미 추출물의 양
- ㉠ 저용량 군을 기준하였을 때, 60 mg/kg(animal dose) X 3/37 = 4.86 mg/kg이므로 70 kg 성인이 섭취해야 할 백장미 추출물의 양은 340 mg / day임.
- ㉡ 주름개선 효과 등 고용량 섭취 시에만 효과를 보인 기능성은 70 kg 성인 기준 300 mg/kg(animal dose) X 3/37 = 24.3 mg/kg이므로 70 kg 성인이 섭취해야 할 백장미 추출물의 양은 1.7 g / day임.
- ⑤ 피부기능효과를 얻기 위해 소아(20 kg)가 섭취해야 할 백장미 추출물의 양
- ㉠ 60mg/kg(animal dose) X 3/25 = 7.2 mg/kg이므로 20 kg 소아가 섭취해야 할 백장미 추출물의 양은 144 mg / day임.
- ㉡ 아토피 피부염에 대한 기능성은 동물실험 결과 30 mg/kg만 섭취했을 때도 효과가 나타났음. 따라서, 20 kg 소아의 경우 하루 72 mg 섭취만으로도 아토피 피부염에 대한 개선 효과를 기대할 수 있음.

표 56. 타겟 기능성 별 백장미 추출물 섭취량 환산표

기능성	주름개선, 보습, 미백 (고용량)	주름개선, 미백 (저용량)	아토피 피부염
성인(70kg)	1.7 g/day	340 mg/day	340 mg/day
소아(20 kg)	720 mg/day	144 mg/day	72 mg/day

(나) 백장미 추출물의 섭취를 통해 피부미용 기능성을 얻기 위해서 섭취해야 할 추출물의 양은 성인(70 kg)은 저농도 기준 하루 340 mg, 고농도 기준 하루 1.7 g이며 소아(20 kg)는 아토피 피부염 개선효과를 기대하기 위해서 하루 72 mg 섭취가 필요함.

나. 항노화 영양 음료 개발

(1) 개발 배경

- (가) 소비자 인구 구성 변화에 따라 노령인구를 대상으로 한 시니어 시장 및 1인 가구 관련 시장 성장할 것으로 전망됨.
- (나) 시니어 산업은 2010년 22조원의 시장을 형성하고 있었으나 2018년 80조원 규모로 성장할 것으로 예측됨에 따라 시니어 맞춤 제품을 출시하여 시니어 식품 시장을 선점이 필요할 것으로 판단.
- (다) 국내 시니어 소비자 특징으로 늙음에 대한 이미지가 연상되는 것을 싫어하고 젊어 보이고 젊게 살고 싶은 욕구가 높음. 따라서 소비 구매력이 높고 스스로를 젊게 인식하는 액티브 시니어층을 대상으로 한 항노화 식품으로 제품 방향 설정

(2) 시장분석

- (가) 국내 항노화 식품 시장은 건강기능식품 시장으로서 1조 4천억 원과 특수의료용도식품으로서 600억 원으로 나뉘어져 있으며, 이 중 시니어 제품이 차지하는 비중은 건강기능식품 중 6300억 원, 특수의료용도식품 중 420억 원 수준임.

(3) 컨셉평가

(가) 제품컨셉

- ① 제품의 메인 컨셉은 피부노화 예방 및 근육 유지를 주 컨셉으로 하는 백장미 꽃잎 추출물 함유 영양 음료로서 건강 유지 및 외모관리에 관심도가 높은 중, 장년층을 타겟으로 함
- ② 근감소증 예방 및 근육 유지를 위하여 고단백 설계(12 g/can)를 하였음.
- ③ 피부노화 예방을 위하여 백장미 꽃잎 추출물을 560 mg/can 함유하였음.(1일 3캔 섭취 시 유효함량 충족)
- ④ 노화 및 면역력 저하 억제를 위해 항산화 / 면역 영양소인 비타민 A, C, E, 아연을 한국인 영양섭취 기준의 50 %수준으로 강화하였음.
- ⑤ 심혈관계 질환 예방에 도움을 주는 고올레산(oleic acid)이 풍부한 카놀라유 함유하였음.
- ⑥ 칼슘 흡수에 도움 및 골다공증 예방에 도움이 되는 비타민 D를 한국인 영양섭취 기준의 50 % 수준으로 강화하였음.

표. 57. 항노화 영양음료 제품 컨셉

제품설명	『노화지연에 도움을 줄 수 있는 항노화 영양 음료』 근육 감소증, 피부 노화, 면역력 저하, 심혈관계 질환 등의 다양한 노화 현상을 지연시키는데 도움을 줄 수 있는 종합 균형 영양 음료입니다.
주요 특징	<ol style="list-style-type: none"> 1. 가령에 따라 발생할 수 있는 근육 감소증을 예방하기 위해 충분한 양의 단백질을 공급합니다. (12 g/1회 제공량, 1000 kcal 섭취 시 ESPEN 임상영양지침 근육 감소증 예방을 위한 1일 권장량 충족) 2. 항산화 효과 및 피부노화 방지(피부주름 개선, 보습, 미백효과)에 도움을 주는 것이 연구 결과를 통해 입증 된 식용 백장미 꽃잎 추출물이 함유되었습니다. 3. 노화 억제 및 면역력 강화를 위해 항산화 / 면역 관련 영양소인 비타민 A, C, E, 아연이 함유되었습니다. (1회 제공량 당 한국인 영양섭취 기준 대비 50 % 수준의 권장량 함유, 20~29세 남성 권장 섭취량 기준) 4. 심혈관계 질환 예방에 도움을 주는 고올레산(High oleic acid)이 풍부한 카놀라유가 함유되었습니다. 5. 칼슘흡수에 도움 및 골다공증 예방에 도움이 되는 비타민D가 함유되었습니다. (1회 제공량 당 한국인 영양섭취 기준 대비 50 % 수준의 권장량 함유)

(나) 제품컨셉 소비자 평가

- ① 컨셉 평가 전문기관인 (주)마크로밀엠브레인에서 실시하였으며, 40~60세 남성 100명, 여성 100명 총 200명을 대상으로 실시하였음.
- ② 설문 대상자들에게 컨셉을 제시 후 제품에 대한 호감도를 5점 척도법(1점 전혀 마음에 안든다, 2점 마음에 안든다, 3점 보통이다, 4점 마음에 든다, 5점 매우 마음에 든다)으로 평가하였음
- ③ 컨셉평가 결과, 제품 구입의향은 전체적으로 높았으며, 각 컨셉에 대한 매력도에서도 대부분 만족하는 결과를 보임.
- ④ 컨셉매력도 분석에서는 단백질 공급, 카놀라유 사용에 대한 컨셉 매력도가 높은 것으로 나타남. 백장미 추출물의 피부주름 개선 효과에 대해서는 컨셉 의심도가 다소 높게 나타나 추후 제품화를 위해서 기능성에 대한 홍보에 집중할 필요성을 확인하였음. (그림. 122)

표 58. 구입의향 조사 결과

구분	구입의향			
	T.B(%)	T.P(%)	T.N(%)	Mean
전체 (n=200)	7.5	64.5	5.5	3.67
남자 (n=100)	6.0	62.0	7.0	3.61
여성 (n=100)	9.0	67.0	4.0	3.72
40대 (n=100)	5.0	63.0	6.0	3.62
50대 (n=100)	10.0	66.0	5.0	3.71

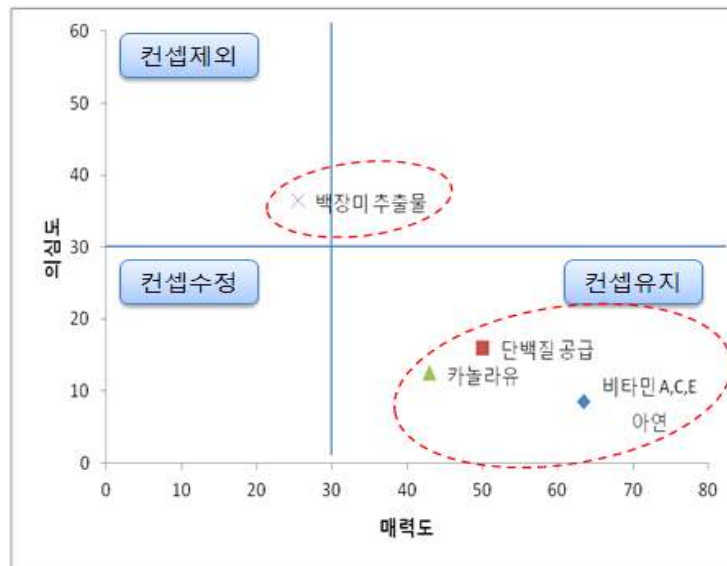


그림 122. 항노화 영양 음료 컨셉 매력도 분석 결과

(4) 레시피 및 공정개발

(가) 레시피 개발

- ① 열량밀도를 아침 대용식으로 이용하기 위하여 1 kcal/ml 수준의 충분한 열량을 제공하게 하였음.
- ② 열량 구성비는 단백질:지방:단수화물의 비율을 24:27:59로 설계하였음. 단백질을 근감소증 예방을 위하여 12 g을 제공할 수 있도록 하였으며, 단백질 원료로 카제인 나트륨, 분리대두단백, 대두유액을 사용하였음. 지방은 대두유액, 카놀라유, 중쇄중성지방을 사용하여 심혈관계 질환 예방 및 소화가 용이하도록 설계함. 또한, 대두유액 유래의 식이섬유가 1.8 g 함유되어 있어 장 건강에도 도움을 줄 수 있도록 하였음.
- ③ 노화 억제 및 면역력 강화를 위해 비타민A, C, E, 아연을 KDRIs 50 %로 강화하였으며, 칼슘 흡수 및 골다공증 예방에 도움을 줄 수 있는 비타민D KDRIs 50 %로 강화하였음.

Table 59. 항노화 영양 음료 제품 설계

구분	내용	비고
제품명 (가칭)	항노화 nutrition drink	<ul style="list-style-type: none"> • 피부노화 방지 및 근육 유지등 노화 예방에 도움이 되는 종합 nutrition drink
제품 유형	혼합음료	<ul style="list-style-type: none"> • 항노화 기능성 nutrition drink
용량/용기	200 mL/캔	<ul style="list-style-type: none"> • 포만감을 느낄 수 있는 적합한 양으로 설정
열량밀도	1.0 kcal/mL	<ul style="list-style-type: none"> • 1 kcal/ml로 충분한 열량 제공 가능, 아침 대용식으로 이용 가능
열량 구성비	P : F : C ratio = 24 : 27 : 59	<ul style="list-style-type: none"> • 고단백 영양설계 (12 g/캔), 영양표시 가능
기능성 소재	백장미꽃잎 추출물 0.56g/can	<ul style="list-style-type: none"> • 농림부 과제(주관기관 : 정식품)를 통해 입증 된 피부노화 방지(주름개선, 미백효과, 아토피 개선)기능성의 백장미꽃잎 추출물 소재 활용 • 3캔 섭취 시 백장미꽃잎 추출물의 피부노화 예방 기능성 유효량 충족 가능 -> <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 실험을 통해 검증한 인체 유효량 1.7 g/d
단백질	카제인나트륨(40 %), 분리대두단백(30 %) 대두유액(30 %) 전체 함량 (12 g)	<ul style="list-style-type: none"> • 1000 kcal 섭취 시 ESPEN 가이드라인 및 미국임상영양학회의 근감소증 예방을 위한 1일 권장량을 충족시킬 수 있도록 단백질 함량 설계 (12 g/can) -> ESPEN, 미국임상영양학회근감소증 예방 가이드라인 함량 : 60-90 g/d -> 12 g/can 설정으로 제품상에 고단백 영양표시 가능 • 동·식물성 단백질 혼합으로 근육 생성 효과 상승 및 아미노산 체내 전달율 상승
지방	대두유액(40 %), 카놀라유(40 %) 중쇄중성지방(20 %) 전체 함량 (6 g)	<ul style="list-style-type: none"> • 고올레산(High oleic acid)이 풍부한 카놀라유 사용 (심혈관계 질환 예방에 도움) • 소화·흡수에 용이한 중쇄중성지방 배합
탄수화물	말토덱스트린, 정백당, 대두유액 전체 함량 23.6 g)	<ul style="list-style-type: none"> • 대두유액 유래 식이섬유 1.8 g배합으로 장건강에 도움
비타민 /무기질	비타민 13종 / 무기질 10종	<ul style="list-style-type: none"> • 노화 억제 및 면역력 강화를 위해 비타민A, C, E, 아연을 KDRIs 50 %로 강화 • 칼슘 흡수 및 골다공증 예방에 도움을 줄 수 있는 비타민D KDRIs 50 %로 강화

(나) 공정개발

① 공정 규격은 Lab scale 제조 실험을 통해 설정하였음. (표 60.)

표 60. 제조 공정 규격

	공정	기기	조건
1	배합	HomoMixer	3,000 rpm 10분 이상
2	저온 저장	저온실	10℃ 이하 냉각
3	균질	Homogenaizer	300bar 이상
4	충진 및 병 밀봉		
5	멸균	Retort	121℃ 20분

② 제품 공정 규격은 주관 연구기관인 (주)정식품의 경장영양 제품군과 제품의 유사성을 바탕으로 동일한 규격범위를 설정하였으며, 제품의 물성을 측정된 결과 비중 1.0738, pH 6.92, 점도 16 cps, 삼투압 520 mOsm/kg, 침전 및 분리는 일어나지 않아 아주 안정적인 물성 형태를 보여주었음.

표. 61, 향노화 영양 음료 제품 규격

	비중	pH	점도	분리도
향노화영양음료	1.0738	6.92	16	없음
대조군 (경장영양제품)	1.0620 ± 0.001	6.7 ± 0.2	30 cps 이하	1 % 이하

③ 미생물 규격은 식품공전 규격과 자사 경장영양제품군과 공통 규격으로 설정하였음.

표. 62, 향노화 영양 음료 미생물 규격

구분	식품공전 기준	자가 규격	
		항목	규격
세균수	1 ml당 100이하	세균수	음성
		멸균공정의 F0값	10분 이상
대장균 군	음성	대장균 군	음성
내열성 세균	-	내열성 세균	음성
바실러스세레우스	1 ml당 100이하	바실러스세레우스	음성

(다) 관능개발

① 영양 설계 후 최종 관능은 미숫가루맛, 누룽지맛, 초코맛 3가지 제품으로 개발 진행 하였으며, (주)정식품 중앙연구소 직원들의 관능 선호도 평가를 통해 최종 관능을 결정하였음.

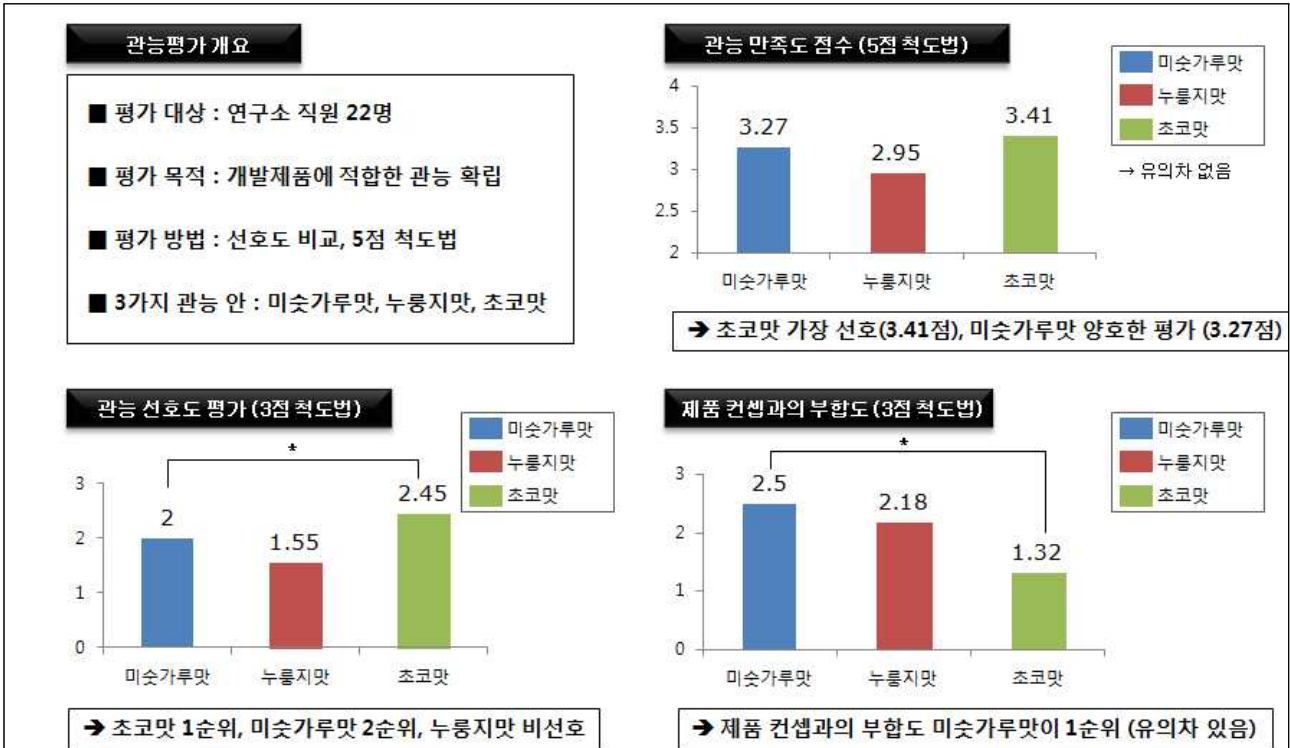


그림 123. 항노화 영양 음료 관능평가 결과

② 관능 만족도에서는 미숫가루와, 초코맛이 누룽지맛보다 앞섰고, 관능 선호도 평가에서는 초코맛이 가장 앞서는 결과를 보였음. 그러나 제품 컨셉과의 부합도에서 미숫가루를 선호하는 응답자가 유의적으로 많은 것으로 나타났기에 미숫가루 맛으로 최종 관능을 결정하였음.

다. 아웃도어 프로테인 워터 개발

(1) 개발 배경

(가) 단백질은 소비자들에게 건강한 식사를 위한 중요한 성분으로 인식되고 있는 영양 성분으로 2014년부터 미국 시장을 중심으로 단백질을 주요 성분으로 하는 음료의 출시가 활발함.

(나) 소비자의 39 %는 고단백과 관련된 표기가 식품의 라벨에서 매우 중요하다고 응답하는 한편, 성인의 65 %는 단백질이 근육을 만드는데 도움이 되며, 34 %는 체중 감소에 도움이 된다고 인지하고 있음.

(2) 시장분석

(가) 2015년 미국의 스포츠 뉴트리션 시장은 약 69억 \$(한화 약 8조원) 시장을 형성하고 있으며 이 중 분말제품이 차지하는 비율은 77 % 수준으로 2020년까지 현재보다 70 % 이상 성장할 것으로 예상됨.

(나) 미국 스포츠 뉴트리션 제품의 주요 표기 사항을 보면 에너지, 근육회복, 단백질 함유 등 단백질 관련 표기가 가장 많음.

(다) 국내 스포츠 뉴트리션 시장은 2015년 기준 약 900억원 대를 형성하고 있으며, 매년 성장하는 추세임. 주로 온라인, 전문 로드샵을 통해 판매되고 있으며, 일반 헬스보충제 외에 프로테인 워터가 최근 출시되기도 하였음.

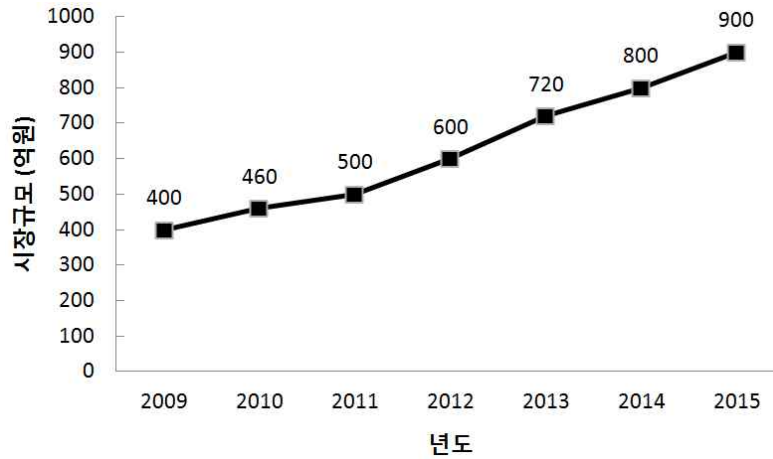


그림124. 국내 스포츠 뉴트리션 시장규모 변화추이

표 63. 국내 유통 스포츠뉴트리션 제품

제품명	프로틴워터	프로티니아	스파토스
제조사	(주)퍼플인사이트	뉴트리랩	Spartan Beverage(美)
출시일	2013년 10월	2013년 10월	2013년 국내 수입
이미지			
	48,000원/700g	3,000원/1병	5,600원/1병

(3) 컨셉평가

(가) 제품컨셉

- ① 제품의 메인 컨셉은 기존 이온 음료의 미네랄, 수분 뿐만 아니라 기능성 단백질과 백장미 추출물을 함유한 신개념 아웃도어 워터로 야외 활동을 많이 하는 30~40대 여성을 주요 타겟층으로 설정하였음.
- ② 소화흡수가 빠른 단백질 펩타이드가 들어있어 운동 능력 및 피로 회복에 도움을 줌.
- ③ 미백에 효과적인 백장미 추출물을 함유하고 있어 잦은 야외 활동으로 피부가 검게 타는 것을 예방해 줄 수 있음.
- ④ 비타민 B군과 비타민C를 강화하여 체내 에너지 이용 및 피로회복에 도움을 주며, 기능성 아미노산 BCAA와 타우린이 풍부한 음료로서 피로 회복에도 도움을 줌.
- ⑤ 언제 어디서든 스틱 1포를 생수 500 mL 1병에 타서 편리하게 음용 가능한 제품.

표 64. 아웃도어 프로테인 워터 제품 컨셉

제품설명	『활력 충전!! 신개념 아웃도어 워터』 운동 또는 야외 활동 중 기존 이온 음료의 미네랄, 수분 뿐만 아니라 소화흡수가 빠른 기능성 단백질을 공급해 줌으로써 운동 능력 및 피로 회복에 도움을 줄 수 있고 미백에 효과적인 백장미 추출물을 함유하고 있어 잦은 야외 활동으로 피부가 검게 타는 것을 예방해 줄 수 있는 기능성 음료입니다.
주요 특징	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기존 이온 음료의 미네랄, 수분 뿐만 아니라 기능성 단백질과 백장미 추출물을 함유한 신개념 아웃도어 워터입니다. 2. 소화흡수가 빠른 단백질 펩타이드가 들어있어 운동 능력 및 피로 회복에 도움을 줍니다. 3. 미백에 효과적인 백장미 추출물을 함유하고 있어 잦은 야외 활동으로 피부가 검게 타는 것을 예방해 줄 수 있습니다. 4. 비타민 B군과 비타민C를 강화하여 체내 에너지 이용 및 피로 회복에 도움을 줍니다. 5. 기능성 아미노산 BCAA와 타우린이 풍부한 음료로서 피로 회복에도 좋습니다. 6. 언제 어디서든 스틱 1포를 생수 500mL 1병에 타서 편리하게 음용 가능합니다

(나) 제품컨셉 소비자 평가

- ① 컨셉 평가 전문기관인 (주)마크로밀엠브레인에서 실시하였으며, 19~45세 여성 75명을 대상으로 실시하였음.
- ② 설문 대상자들에게 컨셉을 제시 후 제품에 대한 호감도를 5점 척도법(1점 전혀 마음에 안든다, 2점 마음에 안든다, 3점 보통이다, 4점 마음에 든다, 5점 매우 마음에 든다)으로 평가하였음
- ③ 컨셉평가 결과, 제품 구매의향은 19~29세를 제외한 30~44세 여성에게서 모두 높게 나타났으며, 35~39세 여성에게서 가장 높게 나타남.
- ④ 컨셉매력도 분석에서는 백장미 추출물의 미백효과에 대한 컨셉 의심도가 다소 높게 나타나 추후 제품화를 위해서 기능성에 대한 홍보에 집중할 필요성을 확인하였음. (그림. 125)

표 65. 구입의향 조사 결과

구분	구입의향			
	T.B(%)	T.P(%)	T.N(%)	Mean
전체 (n=150)	4.0	41.3	16.7	3.29
여성 (n=75)	8.0	40.0	14.7	3.33
19~24세 (n=15)	0.0	33.3	33.3	3.00
25~29세 (n=15)	0.0	46.7	13.3	3.33
30~34세 (n=15)	6.7	40.0	13.3	3.33
35~39세 (n=15)	20.0	46.7	6.7	3.60
40~44세 (n=15)	13.3	33.3	6.7	3.40

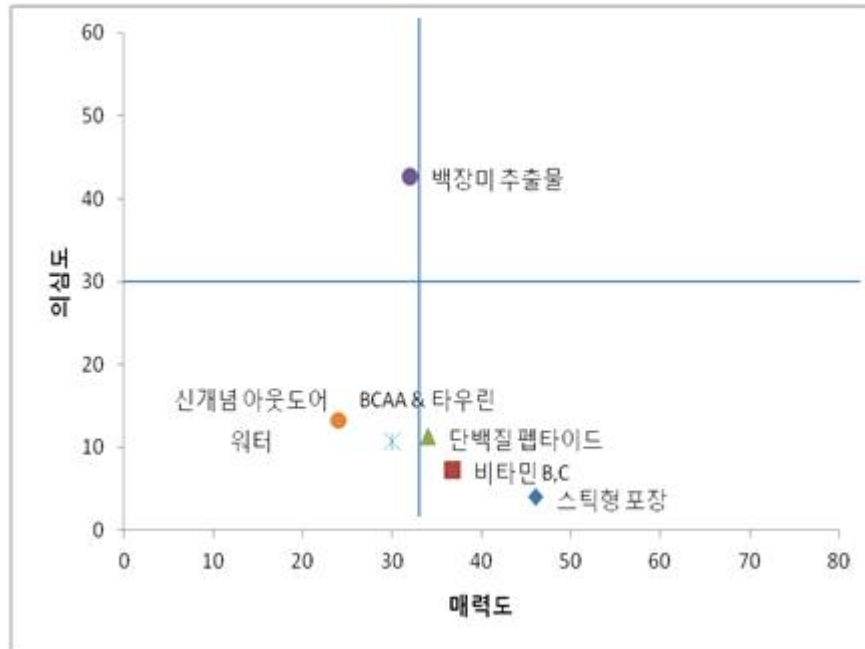


그림125. 아웃도어 단백질 워터 컨셉 매력도 분석

(4) 레시피 및 공정개발

(가) 레시피 개발

- ① 제품 30 g을 물 200 mL에 타서 마시는 제품으로 96 kcal의 열량으로 설계하였음.
- ② 영양 설계는 분리유청단백 6 g에 텍스트린, 정백당, 무수결정포도당의 합으로 18 g 이며 지방은 0 g으로 설계하였음.
- ③ 비타민B군, C를 강화하여 단백질 합성과 근육 조직 복구 등에 필요한 영양소를 보충할 수 있도록 설계하였음.

표 66. 아웃도어 프로테인 워터 제품 설계

구분	설계 방안	내용
제품 유형	기타 가공품	물에 타 먹을 수 있는 분말 형태
용기	파우치	
열량 / 용량	96 kcal/30 g	
단백질	분리유청단백 (6 g)	고급 단백질, PDCAAS 1, 2회 섭취시 건강기능식품으로써 1일 권장 섭취량 충족
지방	0g	無지방컨셉
탄수화물	덱스트린, 정백당, 무수결정포도당(18 g)	운동 후 탄수화물 및 단백질을 함께 섭취할 경우 근육 내 글리코젠 합성에 최적화
비타민 / 무기질	비타민 9종(비타민B군, C 강화)칼슘, 마그네슘, 아연	단백질 합성과 근육 조직 복구 등에 필요한 영양소 (출처: 스포츠 식품영양학, Bodybuilding / 건강기능식품 공전)
기능성 성분	백장미 추출물(170 mg)	야외 활동으로 인한 피부 노화 방지 및 미백에 도움, 1일 2회 섭취시 유효함량 충족

(나) 공정개발

- ① 제품 생산을 위한 공정규격 및 제품규격은 표 67.과 같이 설정하였음.

표 67. 아웃도어 프로테인 워터 제품의 공정 규격 및 제품 규격

항목	내용
공정 규격	<ul style="list-style-type: none"> - 원료 칭량 : 제조지시기록서에 준하여 성분 및 배합비율에 맞게 원료 칭량 - 혼합, 과립 : 아래원료를 제외한 모든 원료를 20mesh체에 체과하여유동층 과립기에 투입, 약 10~15분간 선 혼합 후 과립, 건조한다. (백장미꽃잎추출분말, 레몬향분말, 라임향분말, 효소처리스테비아, 이산화규소) (과립액: 주정 + 백장미꽃잎추출분말) (과립건조물의 수분함량 : 5% 이내) - 혼합 : 과립건조물과 나머지 원료를 20mesh체에 체과한 후 혼합한다. - 충전 조건 : 6열 분말스틱기 사용 / 충전 편차 ± 3%

제품 규격	- 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없어야 한다. - 대장균군 : 음성 - 개별 중량 : 30 g ± 3% (29.1 g ~ 30.9 g)(공전 규격)
-------	--

(다) 관능개발

- ① 향 및 관능은 분리유청단백 특유의 분말취를 마스킹 하기 위하여 라임레몬향으로 정하였으며, 관능평가는 2회에 걸쳐 진행하였으며, 1차는 정식품 중앙연구소 직원 20명을 대상으로 A사 프로테인 워터 제품과 유사한 관능의 이온음료를 대상으로 비교 관능 진행하였으며, 2차 관능평가는 서울과학기술대학교 학생 30명을 대상으로 A사 프로테인 워터와의 비교를 진행하였음.
- ② 1차 관능평가에서는 A사 프로테인 워터 대비 관능 만족도와 선호도는 자사제품이 모두 높게 나타났으며, B사 이온음료와의 비교에서는 만족도는 높게 나타났으나 선호도에서 B사 이온음료제품이 다소 높은 결과를 나타냈음.

표 68. 아웃도어 프로테인 워터 관능만족도 및 관능선호도

	관능만족도	관능선호도
아웃도어 프로테인 워터	3.6 ± 0.8	75 %
A사 프로테인 워터	3.1 ± 0.9	25 %

	관능만족도	관능선호도
아웃도어 프로테인 워터	3.7 ± 0.6	47 %
B사 이온음료	3.3 ± 0.8	53 %

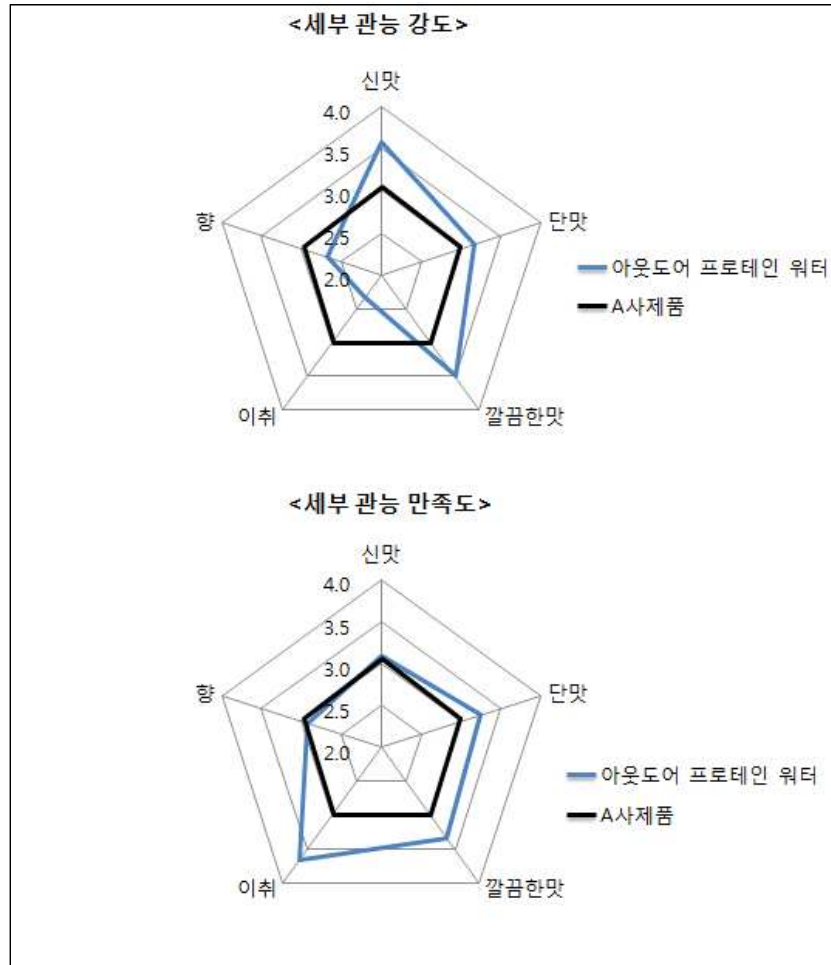


그림 126. 아웃도어 프로테인 워터 관능 강도 및 관능만족도

② 2차 관능평가에서는 A사 프로테인 워터 대비 관능 만족도와 선호도는 자사제품이 모두 앞서는 결과를 얻을 수 있었으며, 세부 관능만족도 역시 본 연구 과제를 통해 개발한 프로테인 워터가 우수함을 확인하였음.

표 69. 아웃도어 프로테인 워터 관능 만족도 및 관능선호도

	관능만족도	관능선호도
아웃도어 프로테인 워터	3.4 ± 0.9	80 %
A사 프로테인 워터	2.4 ± 1.0	20 %

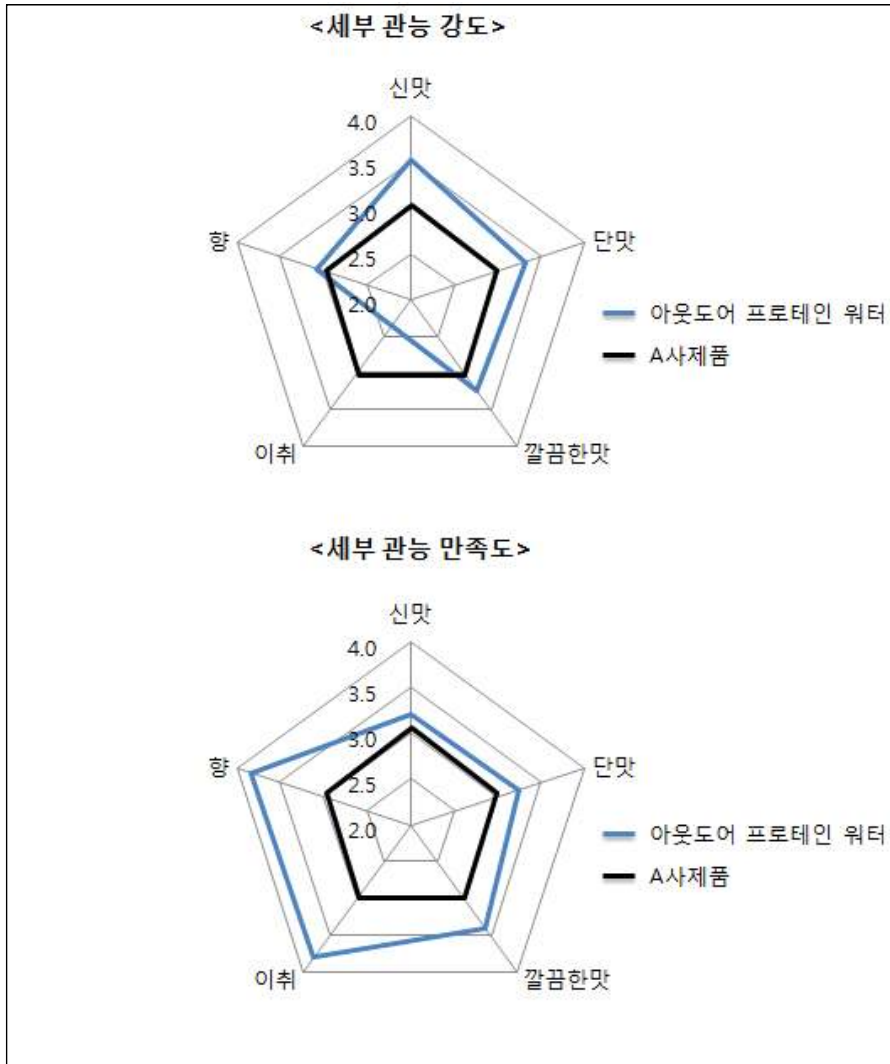


그림 127. 아웃도어 프로테인 워터 관능 강도 및 관능 만족도

라. 소아 아토피 환자용 젤리 개발

(1) 개발 배경

- (가) 2013년 국내 아토피 피부염 환자 수는 101만 명으로 추산되고 있으며, 이 중 10세 미만의 환자 수는 50만 명에 이르고 있음.
- (나) 아토피 피부염은 완치가 어려운 질병으로 증상완화를 위한 치료제인 항 히스타민제와 스테로이드제는 장기간 사용시 각종 부작용을 야기하는 것으로 보고되고 있음. 따라서 부작용 없이 증상을 관리할 수 있는 식이요법의 중요성이 대두되고 있음.
- (다) 소아 아토피 피부염 환자들의 식이관리는 식품 알러지와 관련이 깊어 계란 흰자, 우유, 밀가루 등이 함유된 스낵류의 섭취 주의가 필요함. 따라서 소아 아토피 피부염 환자들이 안심하고 먹을 수 있는 간식의 개발이 필요하다고 판단됨.

(2) 시장분석

(가) 글로벌 아토피 피부염 관련 시장은 2012년 약38억 \$로 매년 그 시장이 성장하고 있으며 2022년까지 56억 \$ 규모로 성장할 것으로 예측됨.

(나) 아토피 피부염 시장은 미국이 가장 크며, 인도, 일본, 독일 등이 그 다음 순위로 영국, 프랑스 등을 포함한 선진국에서 시장이 크게 형성 되고 있어 선진국으로 발전할수록 그 시장 역시 커짐을 알 수 있어, 대한민국 역시 앞으로 시장이 성장할 것으로 예측할 수 있음.

표 70. 국내외 아토피 피부염 환자용 제품

제품명	DERMATIN®	Probiotic for pregnancy®	BYO 우리아이 피부면역을 위한피부 유산균 CJLP-133	면역 N 밸런스
판매사	Progressive health(미국)	Life space(호주)	CJ제일제당	보령수앤수
사진				
제품 기능	염증, 발진, 가려움 완화	면역 증진, 장운동 도움, 소아의 알러지 발생 감소	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움	피부 면역과민반응 개선(정상적인 면역 기능, 면역균형, 피부건강)
용량	500 mg X 60 capsule	280억 live bacteria X 60 capsule	2g X 60포	650 mg X 56정
주요 원재료	아연, 오메가-3, 안티초크, 포도씨추출물, 밀크시슬, 올리브잎 추출물, 감마리놀렌산, 히알루론산, 콜라겐	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 등 11종	<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP-133, 이눌린/치커리 추출물	다래추출물, 산화아연, 비타민A, 비타민D3, 프락토올리고당, 민들레추출물분말, 칩뿌리추출물분말, 여주추출분말, 클로렐라, 프로바이오틱스
주요 특징	피부염증 완화기능성분들과 함께, 피부 탄력에 도움을 주는 콜라겐, 히알루론산 함유	임상실험 연구결과 - <i>L. rhamnosus</i> (60억 마리)를 임신 34주차부터 모유 수유기 6개월까지 매일 섭취시 아이들에게서 습진 또는 고초열 같은 알레르기성 질환이 최대 44%까지감소	“면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있습니다”로 개별인정을 받은 건강기능식품(생리활성2등급)	“면역과민반응 개선에 도움을 줄 수 있음” 개별인정형 건강기능식품(생리활성 2등급)

(3) 컨셉평가

(가) 제품컨셉

- ① 제품의 메인 컨셉은 소아 아토피의 피부 가려움과 상처에 의한 염증을 완화하고 예방하는데 도움을 주는 제품으로 곰돌이 인형모양을 한 구미 젤리 제품임
- ② 아토피 피부염 증상 개선 효능이 입증된 백장미 추출물이 함유되어 있어 가려움증과 피부염증을 완화하는데 도움을 줄 수 있음..
- ③ 아토피 피부염 환자에게 부족한 감마리놀렌산이 풍부한 달맞이꽃 종자유가 함유되어 있어 아토피성 피부 습진 완화 및 피부건강에 도움을 줌.
- ④ 면역력 강화와 아토피 피부염에 의한 가려움증에 효과가 있는 것으로 알려진 비타민 B 군이 함유되어 있음.

표 71. 소아 아토피 환자용 젤리 제품 컨셉

제품설명	『아토피 피부염 예방 및 치료에 도움을 주는 백장미 추출물과 달맞이꽃 종자유가 함유된 아토피 피부염 소아 환자를 위한 영양 보조 제품』 소아 아토피의 피부 가려움과 상처에 의한 염증을 완화하고 예방하는데 도움을 주는 제품입니다. 농림축산식품부 연구과제를 통해 개발된 백장미 추출물과 감마리놀렌산이 풍부한 달맞이꽃 종자유를 함유하여 아토피 피부염 소아 환자의 피부 관리에 도움을 줍니다.
주요 특징	1. 전임상 연구를 통해 아토피 피부염 증상 개선 효능이 입증된 백장미 추출물이 함유되어 있어 가려움증과 피부염증을 완화하는데 도움을 줄 수 있습니다.(20kg 소아 기준 백장미 추출물 72mg/일 섭취시) 2. 아토피 피부염 환자에게 부족한 감마리놀렌산이 풍부한 달맞이꽃 종자유가 함유되어 있어 아토피성 피부 습진 완화 및 피부건강에 도움을 줍니다. 3. 면역력 강화와 아토피 피부염에 의한 가려움증에 효과가 있는 것으로 알려진 비타민 B 군이 함유되어 있습니다.

(나) 제품컨셉 소비자 평가

- ① 컨셉 평가 전문기관인 (주)마크로밀엠브레인에서 실시하였으며, 20~40대 남성 및 여성 150명을 대상으로 실시하였음.
- ② 설문 대상자들에게 컨셉을 제시 후 제품에 대한 호감도를 5점 척도법(1점 전혀 마음에 안든다, 2점 마음에 안든다, 3점 보통이다, 4점 마음에 든다, 5점 매우 마음에 든다)으로 평가하였음
- ③ 컨셉평가 결과, 제품 구매의향은 20대 여성층에서 가장 높았으며, 제시된 컨셉에 대해서는 전체적으로 만족하는 것으로 나타남.

- ④ 백장미와 아토피 피부염 증상 완화와 이미지가 어울리는가에 대한 응답으로 아주 잘 어울린다는 응답이 전체 32 %, 백장미와 피부건강과의 이미지가 어울린다는 응답이 전체 31 %로 백장미와 피부 건강과의 이미지가 어울린다는 응답이 많았음.
- ⑤ 컨셉매력도 분석에서는 제시한 모든 컨셉에 대하여 만족하는 것으로 나타남.(그림. 128)

표 72. 구입의향 조사 결과

구분	구입의향			
	T.B(%)	T.P(%)	T.N(%)	Mean
전체 (n=150)	4.7	56.0	6.7	3.54
남자 (n=75)	2.7	54.7	8.0	3.49
여성 (n=75)	6.7	57.3	5.3	3.59
20대 (n=50)	10.0	54.0	12.0	3.52
30대 (n=50)	0.0	56.0	4.0	3.52
40대 (n=50)	4.0	58.0	4.0	3.58



그림 128. 소아 아토피 환자용 젤리 컨셉 매력도 분석

(4) 레시피 및 공정개발

(가) 물성개발

① 젤리 베이스 구현

- ㉠ 구미젤리의 식감을 구현하기 위하여 돈피 젤라틴을 사용했으며, 구미젤리 타입에 가장 적합한 강도를 구현하기 위하여 수분함량 25 % 이하, 젤라틴 함량 6~8 %로 설계하였음.
- ㉡ 백장미 꽃잎 추출물을 함유함에 따라 젤리 베이스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 백장미 꽃잎 추출물을 0 %, 0.5 %, 1 %, 2.5 %, 3.5 %, 4.5 % 총 6가지 함량으로 제조하여 비교 평가하였음.

표 73. 백장미 꽃잎 추출물 함량 최적화 실험 설계

구분	T1	T2	T3	T4	T5	T6
백장미 꽃잎 추출물 함량	0 %	0.5 %	1 %	2.5 %	3.5 %	4.5 %

② 색도

- ㉠ 아토피 환자용 젤리 제품은 백장미 추출물을 함유함으로써 추출물 특유의 연한 갈색을 띠는 것이 특징임. 기타 제품이 색소를 사용하는 것과 달리 색소를 사용하지 않고서도 오렌지향과 어울리는 연한 갈색을 구현할 수 있는 장점이 있음.
- ㉡ 색도의 측정은 미놀타 CR-300모델로 Hunter system으로 측정하였음.
- ㉢ 백장미 추출물이 함유된 젤리는 0 % 대비 명도는 낮아졌으며, 0.5 % 추출물을 함유한 샘플은 황색을 띄고 있으며, 1.0 % 추출물을 함유한 샘플은 적황색, 그리고 백장미 추출물 함량이 많아질수록 진한 갈색으로 변화함을 알 수 있음.(그림. 129.)
- ㉣ 색도 측정에서도 앞선 관능평가에서와 동일하게 0.5%의 추출물을 함유하였을 때, 가장 오렌지향의 젤리와 어울리는 노란색의 색상을 나타내는 것을 확인하였음.

표 74. 소아 아토피 환자용 젤리의 명도(L), 적색도(a), 황색도(b) 측정결과

White rose extract content	L	a	b
0 %	34.53	0.03	3.15
0.5 %	27.59	2.70	5.68
1.0 %	26.48	4.31	4.46
2.5 %	26.86	2.31	4.43
3.5 %	26.33	1.55	4.12
4.5 %	28.38	1.43	4.58



그림 129. 백장미 추출물 함량별 소아 아토피 환자용 젤리

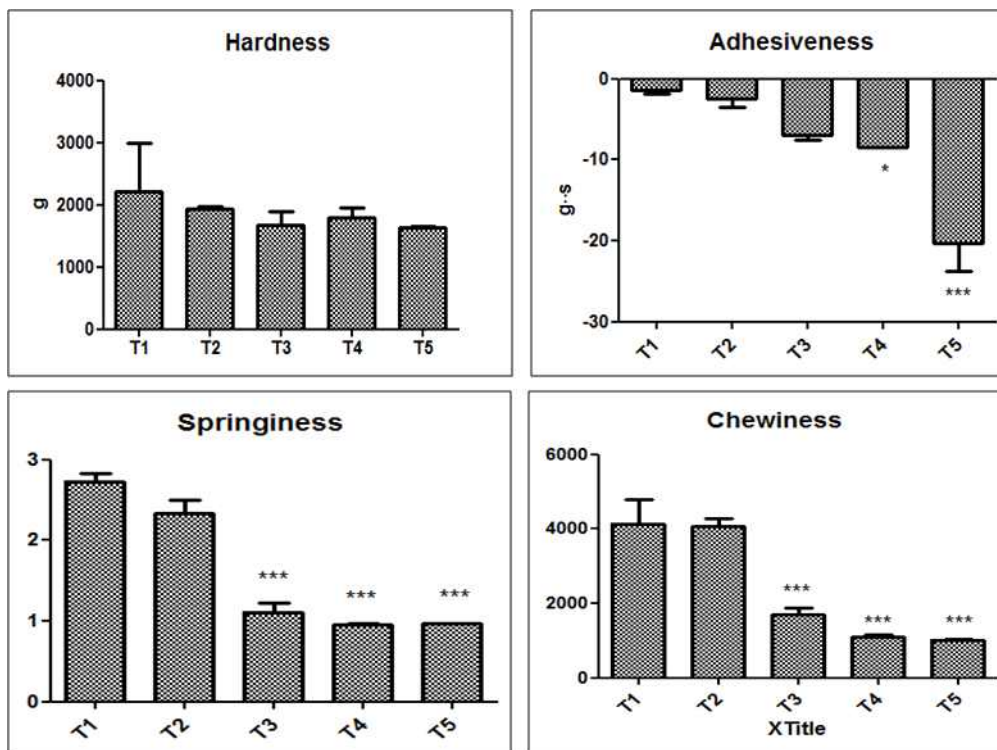
③ 물성 측정(TPA test)

- ㉠ TPA test는 texture profile analysis의 약자로 샘플을 연속으로 2번 압축하여 응집성, 점착성, 탄성, 검성, 씹힘성 등을 알아볼 수 있는 대표적인 식품물성 측정 방법.
- ㉡ 시료는 1cm X 1cm로 준비하여 TA-XT express모델을 이용하여 20mm Plunger로 측정하였음.

- ㉔ 백장미 추출물이 많이 함유될 수록 강도, 점성, 씹힘성, 탄력성, 점착성이 모두 감소하는 경향을 나타냈으며, 복원력과 관련된 cohesiveness와 resilience는 0 %, 0.5 %, 1.0 %의 범위까지는 유사했으나 백장미 추출물 함량이 2.5 %이상이 되면 감소하는 경향을 보임.(표 84, 그림. 142)
- ㉕ 물성, 색도, 관능평가 등 종합적으로 봤을 때, 백장미 추출물의 함량은 0.5 % 내지는 1.0 % 함량이 가장 적합한 것으로 나타나 개발 제품의 추출물 함량이 적합하다는 것을 알 수 있음.

표 75. 소아 아토피 환자용 젤리의 물성 특성

White rose extract content	0 %(T1)	0.5 %(T2)	1.0 %(T3)	2.5 %(T4)	3.5 %(T5)
Hardness(g)	2211.53	1926.20	1677.67	1793.77	1625.73
Adhesiveness(g·s)	-1.33	-2.40	-6.97	-8.50	-20.37
Springiness	2.73	2.33	1.11	0.96	0.97
Chewiness	4143.60	4072.29	1695.16	1102.14	1023.34
Gumminess	2053.82	1713.84	1535.87	1152.77	1050.51
Cohesiveness	0.93	0.91	0.91	0.64	0.65
Resilience	0.96	0.96	0.93	0.51	0.50



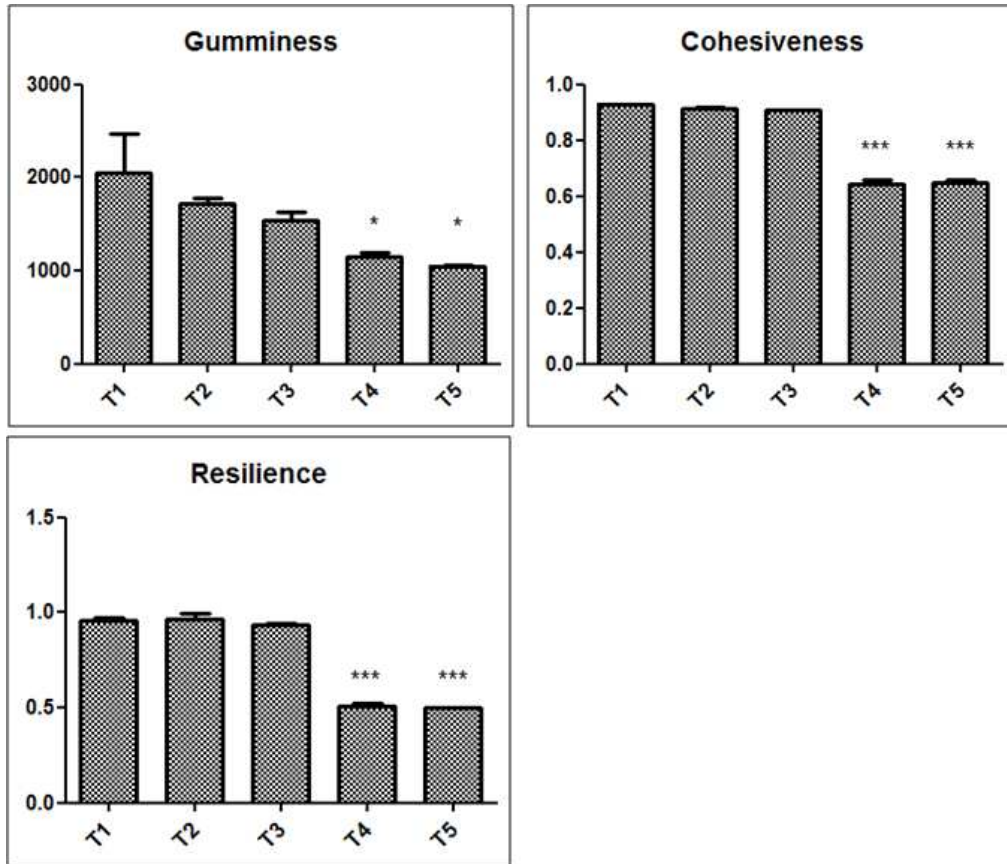


그림. 130. 소아 아토피 환자용 젤리의 물성 특성

(나) 레시피 개발

- ① 소아 아토피 환자의 증상을 완화하기 위한 부재료를 선정하기 위하여 여러 논문을 검색하였으며, 달맞이꽃종자유가 아토피 피부염 증상 완화에 도움이 된다는 것을 확인.(Chung, Bo Young, *et al.*(2013)) 40명의 아토피 피부염 환자를 대상으로 8주간 달맞이꽃 종자유를 160mg, 320mg을 투여한 그룹의 피부염 증상이 완화된 것을 확인하였음. 따라서, 백장미 꽃잎 추출물과 함께 달맞이꽃 종자유를 부원료로 하루 섭취 160mg으로 설계. 또한, 호주산 유기농 원료를 사용하여 잔류농약, GMO등의 우려를 최소화.
- ④ 아토피 피부염 환자들이 기피하는 성분들이 주로 화학적인 식품첨가물임을 감안하여 비타민2종(B₁₂, D₃)은 천연유래 비타민으로 건조효모를 사용하였음.
- ⑤ 향 역시 인공 향을 배제하고 천연 오렌지향을 사용함으로써 아토피 피부염 환자들이 안심하고 먹을 수 있는 제품으로 설계.
- ⑥ 백장미 꽃잎 추출물의 섭취량은 동물실험 결과를 바탕으로 인체 체표면을 기준으로 환산하여 소아(20 kg)기준 하루 72 mg 섭취로 결정하였음.
- ⑦ 백장미 꽃잎 추출물 함량에 따른 젤리 물성 및 관능검사 결과를 통하여 500 μ g~1000 μ g / g 수준의 추출물 함량이 가장 적합하다는 것을 확인. 젤리 1개(2.5 g)당 12 mg 함량으로 설계하여 1일 6개 섭취시 72 mg을 섭취할 수 있도록 설계하였음.

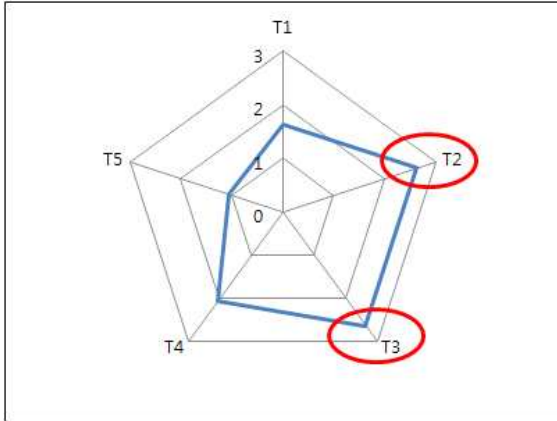
표 76. 소아 아토피 환자용이상입니다. 젤리 제품 설계

구분	설계 방안	내용
제품 유형	캔디류/젤리	구미젤리 타입의 어린이용 간식
제품명	화이트 아토피어	부서 내 네이밍 공모를 통해 선정
용기	PET	
열량 / 용량	1일 섭취량(6개) 섭취 기준 44.5kcal 2.5 g 구미 60 EA 入	1병당 구미젤리 60개입들이
단백질	젤라틴(7.8 g/100 g)	구미젤리 제형 구현을 위한 젤라틴 사용 - 젤라틴 농도별 구미젤리 베이스 구현 실험을 통해 설정
지방	유기농 달맞이꽃 종자유 (1.07 g/100 g)	아토피 환자 증상 개선에 도움 -달맞이꽃 종자유의 섭취량에 따른 아토피 피부 염 증상 개선에 관한 연구논문 참고하여 설정
탄수화물	정백당, 물엿 (64.3 g/100 g)	구미 젤리 제형 구현을 위한 정백당과 물엿 사용
비타민	천연 비타민 2종(비타민 B ₁₂ , D ₃ 강화)	피부면역력 증강 및 아토피 증상 완화 관련 연구 결과가 확인된 비타민 2종 사용 아토피 피부염 환자들의 선호도를 고려하여 천연 원료 사용 6~8세 아동 권장섭취량 및 충분섭취량의 50 % 함유
기능성 성분	백장미 꽃잎 추출물 (490 mg/100 g)	농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업의 협 동연구기관인 충북대학교 수의학과 동물실험 결과 를 바탕으로 유효함량 설정 아토피성 피부염 환자의 가려움증 완화에 도움 섭취량 : 1일 백장미 꽃잎 추출물 72 mg 섭취
섭취방법	1일 6개 섭취 권장	어린이 환자용 구미 젤리 제품으로 유효함량을 6 개 분량을 나누어 설정, 간식처럼 수시로 섭취

(다) 관능개발

- ① 아토피 환자용 젤리의 관능은 젤리 베이스 구현을 위하여 사용된 정백당, 물엿의 함
량으로 인하여 기본적으로 단맛을 구현함.
- ② 향은 천연 오렌지향을 사용하여 과일 맛의 기타 구미젤리와 유사한 관능을 구현함.
- ③ 백장미 꽃잎 추출물 함량별 관능선호도를 검사한 결과 0.5 %, 1.0 % 의 백장미 꽃
잎 추출물이 함유된 젤리가 백장미 추출물이 없는 젤리나 2.5%이상 함유된 젤리 보
다 선호도가 좋게 나타났음. 백장미 추출물이 과량 함유될 경우 특유의 쓴맛으로 인
하여 관능선호도가 떨어짐.
- ④ 세부 관능 평가결과 백장미 추출물의 함량이 0.5 %와 1.0 %일 때 탄성이나 강도면
에서 우수하며 쓴 맛은 적게 느끼는 것으로 나타났음.(그림. 131)

(A)



(B)

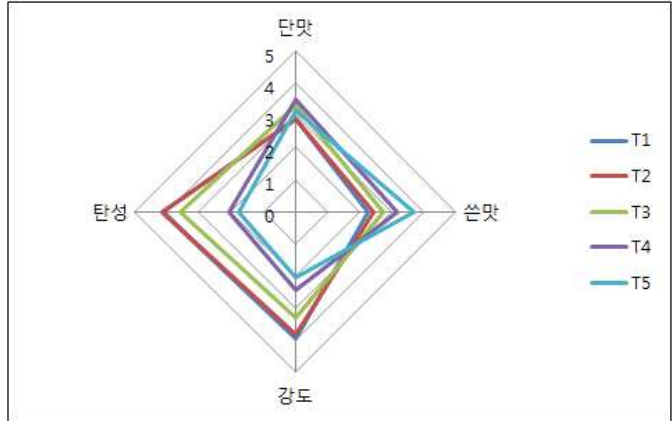


그림 131. 백장미 추출물 함량에 따른 관능 선호도(A) 및 세부 관능강도(B) 평가 결과

④ 제품 관능평가는 ㈜정식품 중앙연구소 직원 20명을 대상으로 시판중인 A사 멀티비타민 구미 젤리와 비교 관능을 진행하였고, 관능만족도는 유사하나 선호도는 자사 개발제품이 더 우수한 것으로 나타났음.

표 77. 소아 아토피 환자용 젤리 관능 만족도 및 선호도

	관능만족도	선호도
소아 아토피 환자용 젤리	3.60 ± 0.75	70%
A사제품	3.65 ± 0.59	30%

(라) 공정개발

① 공정 규격은 Lab scale 제조 실험을 통하여 설정하였음. (표 78.)

표 78. 제조 공정 규격

	공정	기기	조건
1	젤라틴 용해	항온수조	젤라틴 : 80 °C에서 중탕
2	배합		
3	가열	가열 T/K	125 °C가 넘지 않도록 가열
4	농축	가열 T/K	
5	건조		상온에서 직사광선을 피하여 3일간

② 미생물 규격은 식품공전 규격에 따라 설정하였음.

표 79.. 소아 아토피 환자용 젤리 미생물 규격

구분	식품공전 기준
세균수	1g당 10,000이하

마. 갱년기 여성 두유 개발

(1) 개발 배경

- (가) 시니어(40-59세) 인구는 전체의 인구의 33.4 %, 2018년 까지 증가 할 것으로 예측되고 있으며 시니어 층의 높은 보유 자산은 구매력에 반영되어 관련시장의 성장 주도할 것으로 예상됨.
- (나) 인구 고령화의 가속화로 시니어 및 노년층 대상 시장은 지속적으로 성장할 것으로 전망되어 확대되는 시장에 발맞춰 시니어 맞춤형 제품 개발 필요하다고 평가됨.
- (다) 중년 여성층은 음용율과 음용빈도 및 구입량이 높은 두유시장의 핵심 소비자층으로 소비자 조사 결과 해당 층의 니즈는 ‘건강에 좋은, 다양하고 고른 영양소의 섭취, 좋은원료’로 분석됨.
- (라) 시장 현황, 소비자 조사 결과 등을 바탕으로 중년 여성층 이슈 1순위 질환인 갱년기 여성 건강 개선을 주요 컨셉으로 하며 중년 여성층의 주요 관심사인 피부건강을 개선을 부컨셉으로 하는 두유를 개발하기로 결정함.

(2) 시장분석

- (가) 한국 여성의 폐경 연령 및 증상 경험률 기반으로 추산 시 갱년기를 겪는 여성은 45-55세로 약 390 만명 수준
- (나) 평균수명 증가로 폐경 후 인구의 비율은 31.8%이며 기간으로는 수명의 1/3-1/2의 기간에 해당함.
- (다) 여성 갱년기 제품은 2010년 백수오 소재 개발 후 2015년 까지 1000억 규모 시장으로 성장하였음.

(3) 컨셉평가

(가) 제품컨셉

- ① 제품의 메인 컨셉은 중년 여성들의 갱년기 건강과 피부건강을 이소플라본이 풍부한 대두배아와 백장미 추출물로 지켜주는 중년여성 맞춤형 두유로서 갱년기 증상 완화 및 피부건강 개선을 원하는 40대 중반에서 50대 중반의 여성층을 타겟으로 함.

- ② 갱년기 여성 건강에 도움을 주는 이소플라본이 풍부한 대두배아(콩눈)를 사용하여 한 팩(190 ml) 기준 이소플라본 20 mg을 함유하였음.
- ③ 피부건강에 도움을 주는 백장미 꽃잎 추출물을 170 mg/can 함유하였음.(1일 2팩 섭취 시 유효함량 충족)
- ④ 뼈 건강을 위해 칼슘(200 mg)과 비타민D(5 μ g)를 풍부하게 함유하였음
- ⑤ 여성들의 건강한 활력을 위해 면역 강화소재 베타글루칸 10 mg과, 혈액순환에 도움을 주는 불포화지방산 오메가3, 300 mg을 함유하였음
- ⑥ 콩 본연의 담백함과 자극적이지 않은 부드러운 맛으로 간식이나 식사대용으로 부담 없이 즐기면서 갱년기 건강과 피부건강까지 동시에 챙길 수 있는 건강 음료임.

표. 80. 갱년기 여성용 두유 제품 컨셉

제품설명	『여성의 변치 않는 건강과 아름다움을 위한 맞춤두유』 갱년기 증상 개선에 도움을 주는 이소플라본이 풍부한 대두배아와, 피부건강을 위한 이너뷰티 소재인 백장미 꽃잎 추출물을 설계한 여성들을 위한 맞춤두유입니다.
주요 특징	<ol style="list-style-type: none"> 1. 갱년기 여성 건강에 도움을 주는 이소플라본이 풍부한 대두배아(콩눈)를 적용, <u>한 팩(190 ml) 기준 이소플라본 20 mg</u>을 설계하였습니다. 2. 피부건강에 도움을 주는 백장미 꽃잎 추출물을 한 팩(190 ml) 기준 약 170 mg으로 설계하여 아름다운 피부를 유지시켜 줍니다. 3. 뼈 건강을 위해 <u>칼슘(200 mg)과 비타민D(5 μg)</u>를 풍부하게 함유하였습니다. 4. 여성들의 건강한 활력을 위해 면역 강화소재 베타글루칸(10 mg)과, 혈액순환에 도움을 주는 불포화지방산(오메가3, 300 mg)을 설계하였습니다. 5. 콩 본연의 담백함과 자극적이지 않은 부드러운 맛으로 간식이나 식사대용으로 부담 없이 즐기면서 갱년기 건강과 피부건강까지 동시에 챙길 수 있는 건강 음료입니다

(나) 제품컨셉 소비자 평가

- ① 소비자 평가는 컨셉 평가 전문기관인 (주)마크로밀엠브레인에서 실시하였으며, 30~50세 여성 150명을 대상으로 실시하였음. 이 중 주 타겟은 45~54세 여성이며, 30~44세, 55~59세를 부 타겟으로 설정함.
- ② 설문 대상자들에게 컨셉을 제시 후 제품에 대한 호감도를 5점 척도법(1점 전혀 마음에 안든다, 2점 마음에 안든다, 3점 보통이다, 4점 마음에 든다, 5점 매우 마음에 든다)으로 평가하였음
- ③ 컨셉평가 결과, 30대를 제외하고 구매의향에서 높은 만족도를 보였고, 적정 소비자는 970원으로 조사됨.
- ④ 컨셉매력도 분석에서는 전반적으로 컨셉 매력도가 높은 것으로 나타났으나, 백장미 추출물의 피부건강 효과에 대해서는 컨셉 의심도가 다소 높게 나타나 추후 제품화를

위해서 기능성에 대한 홍보에 집중할 필요성을 확인하였음. (그림. 132)

표 81. 구입 의향 조사 결과

구분	구입 의향			
	T.B.(%)	T.P.(%)	T.N.(%)	mean
전체	8.0	62.0	8.7	3.61
30대 (n=30)	0.0	36.7	13.3	3.20
40대 (n=60)	10.0	66.7	8.3	3.68
50대 (n=60)	10.0	70.0	6.7	3.73
주타겟 (n=60)	15.0	73.3	3.3	3.9
부타겟(n=90)	3.3	54.4	12.2	3.4

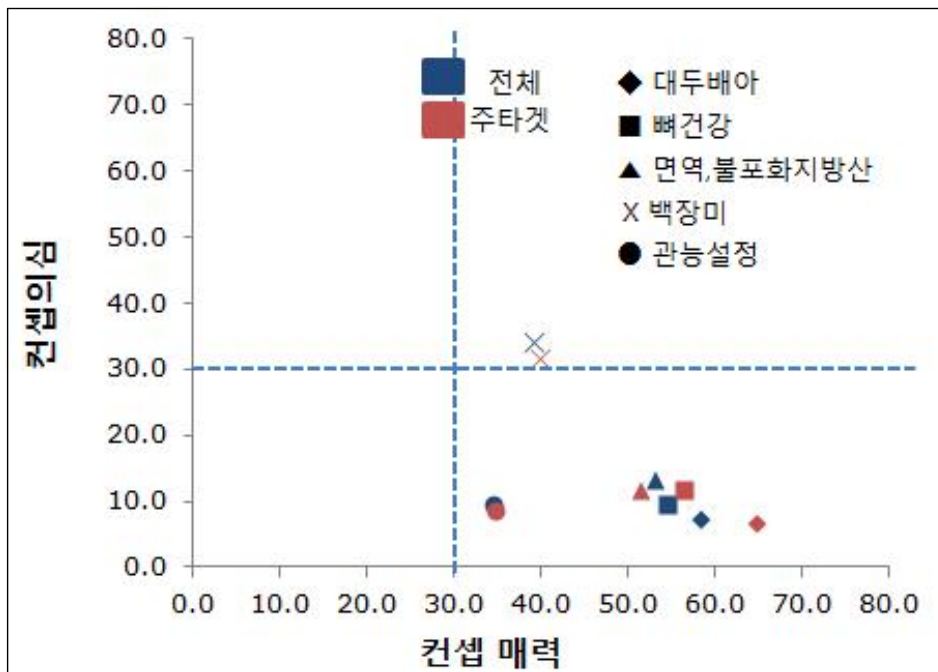


그림 132. 갱년기 여성용 두유 컨셉 매력도 분석 결과

(4) 레시피 및 공정개발

(가) 레시피 개발

- ① 두유액 92 %에 이소플라본이 풍부한 볶은대두배아분말을 0.5 % 함유하였으며, 대두배아분말 특유의 쓴 맛을 마스킹 하기 위하여 정백당을 이용하였음.
- ② 정백당을 사용하여 단맛을 낸 제품으로 감미도는 3.5와 4.2 두 가지 타입으로 설계하였음.
- ③ 갱년기 주요 증상인 골다공증 예방 및 개선에 도움을 주는 칼슘을 200 mg, 비타민 D₃를 5 μ g 함유하도록 설계하였음.

④ 면역소재인 베타글루칸 10 mg과 오메가3지방산을 함유한 아마씨유를 300 mg 사용하였음.

표 82. 갱년기 여성용 두유 제품 설계

구분	내용
제품 컨셉	중년 여성들의 갱년기 건강과 피부건강을 이소플라본이 풍부한 대두배아와 백장미 추출물로 지켜주는 중년여성 맞춤형 두유
세부컨셉	① 갱년기 증상 완화에 도움을 주는 이소플라본이 풍부한 볶은대두배아분말을 첨가한 두유 → 예상 배합비: 0.5 % (190 mg/1팩) → 총 이소플라본 함량 팩당 약 20mg 전후 (일일 40 mg)
	② 중년 여성의 소비패턴 및 인식 변화로 증가한 미용에 대한 관심 충족을 위한 피부건강 소재활용 → 자사 연구과제를 통해 항산화, 주름개선, 미백등에 효과가 있는 것으로 알려진 백장미 추출물활용 → 한팩당 추출물 170 mg 수준 설계
	③ 갱년기 주요 증상인 골다공증 예방, 개선에 도움을 주는 칼슘(200 mg) 과 비타민D3(5ug) → 부족한 섭취량을 충족해주는 풍부 수준의 설계
	④ 면역소재 베타글루칸(10 mg) , 오메가3지방산아마씨유(300 mg) 활용
타겟	주타겟: 갱년기 증상 완화 및 피부건강 개선을 원하는 40대중반-50대 중반 갱년기 여성층 부타겟: 갱년기 예방 및 피부건강 관리를 원하는 30대중반-40대 초반 여성과 갱년기 이후 여성층
예상 원재료	두유액, 대두배아분말, 백장미 추출물, 정백당, 베타글루칸, 아마씨유등

(나) 공정개발

① 공정 규격은 Lab scale 제조 실험을 통해 설정하였음. (표 83.)

표 83. 제조 공정 규격

	공정	기기	조건
1	배합	HomoMixer	80 °C, 3,000 rpm 30분 이상
2	균질	Homogenaizer	250 bar 이상
3	충진 및 병 밀봉		
4	멸균	Retort	121 °C 10분

② 미생물 규격은 식품공전 규격으로 설정하였음.

표 84, 갱년기 여성용 두유 미생물 규격

구분	식품공전 기준
세균수	1 mL당 40,000이하
대장균 군	1 mL 당 10이하
내열성 세균	-
바실러스세레우스	1 ml당 100이하

(다) 관능개발

① 두 가지 타입의 감미를 가진 제품에 대하여 최종 관능을 결정하기 위하여 정식품 중앙연구소 내 직원들을 대상으로 한 소내 관능평가와 외부 관능평가를 통하여 관능검사를 진행하였음.

표 85, 감미도에 따른 갱년기 여성용 두유 관능 만족도

구분	Type A(감미3.5)	Type B(감미4.2)
소내 관능평가	3.47	3.68
외부 관능평가	3.46	3.13

2. 제품의 시생산

가. 시생산 품목의 결정

- (1) 백장미 꽃잎 추출물을 함유한 항노화 영양음료, 아웃도어 프로테인 워터, 소아 아토피 환자용 젤리, 갱년기 여성용 두유 개발 제품에 대하여 시장성, 제품 완성도, 관능만족도, 소비자 설문조사 등을 종합하여 사업화 가능성이 높은 품목을 시생산 진행하기로 결정함.
- (2) 자체 평가 결과 항노화 영양음료와 갱년기 여성용 두유는 제품 매력도 및 완성도는 높은 점수를 얻었으나, 시장성에서 낮은 점수를 받아 사업화 가능성이 낮다고 평가됨.
- (3) 아웃도어 프로테인 워터와 소아 아토피 환자용 젤리는 시장성, 제품 완성도, 관능만족도 등 전반적인 항목에서 높은 평가를 받아 시생산 품목으로 결정함.
- (4) 따라서 아웃도어 프로테인 워터와 소아 아토피 환자용 젤리를 OEM으로 (주)코스맥스 바이오와 (주)남양F&B에서 각각 생산하기로 결정함.

나. 제품 네이밍 및 디자인

(1) 네이밍

- (가) 시생산 제품의 네이밍 및 선정은 (주)정식품 중앙연구소의 연구원 제안 및 선정 평가 투표로 진행되었음.
- (나) 아웃도어 프로테인 워터의 네이밍은 백장미의 피부미백 기능성과 야외 활동에 필요한 단백질을 함유한 제품을 연상시킬 수 있는 ‘화이트 액티브 워터’로 결정되었으며, 소아 아토피 환자용 젤리는 백장미를 연상시키는 ‘화이트’에 아토피를 연상시키는 ‘아토’그리고 곰돌이 모양에서 따와 ‘화이트 아토 베어’라는 이름으로 결정되었음.

(2) 디자인

- (가) 제품 디자인은 홍보, 기획, 디자인 광고 등을 대행하는 (주)오쎬에 의뢰하여 진행하였음.
- (나) ‘화이트 액티브 워터’의 디자인은 음료의 청량감을 연상시킬 수 있는 푸른색 개통의 디자인으로 (주)정식품의 특수의료용도 식품 브랜드인 그린비아 브랜드를 사용하였음.



그림. 133. 화이트 액티브 워터 포장 디자인

(다) ‘화이트 아토 베어’의 디자인은 젤리 모양인 곰인형 모양을 메인으로 하여 주요 소비자층인 소아에게 호기심을 유발할 수 있도록 디자인하였으며, (주)정식품의 특수의료용도 식품 브랜드인 그린비아 브랜드를 사용하였음



그림 134. 화이트 아토베어 포장 디자인

다. 아웃도어 단백질 워터의 생산

- (1) (주)코스맥스바이오는 충북 제천에 위치한 건강기능식품 제조 업체로 OEM 및 ODM 방식으로 제품을 생산하고 있으며 과립형태의 분말 제품을 생산할 수 있는 전문업체로 아웃도어 단백질 워터를 생산하기 가장 적합한 회사로 평가되었음.
- (2) 아웃도어 단백질 워터는 OEM방식으로 생산하였으며, 생산량으로는 300 kg, 완제품 수량으로는 약 10,000포를 생산하였음.
- (3) 제품의 제형은 분말형태로 찬물에도 잘 녹게 하기 위하여 과립형태로 제조하였으며, 정제수 10%를 혼합하여 60℃에서 과립공정을 거친 뒤, 향분말, 감미료, 이산화 규소를 첨가하여 혼합하였으며 더블콘 믹서 혼합 방식으로 혼합하였음.
- (4) 수율체크, 성상 및 수분함량 입자도 등을 확인한 후 포장하였음.



150kg 혼합 탱크
과립 및 혼합(약 5분)



더블 콘 믹서 혼합

그림 135. 화이트 액티브 워터 제조 공정



그림 136. 화이트 액티브 워터 시생산 제품

라. 소아 아토피 환자용 젤리의 생산

- (1) (주)남양F&B는 충북 음성에 위치한 건강기능식품 제조업체로 OEM/ODM방식으로 주로 제품을 생산하고 있으며, 건강기능식품 젤리를 국내에서 가장 많이 생산하고 있는 업체 중 하나임.
- (2) 소아 아토피 환자용 젤리는 OEM방식으로 (주)남양F&B에서 생산하였으며, 생산량으로는 52 kg, 완제품으로 약 270병을 생산하였음.
- (3) 주원료 용해탱크에서 젤라틴 4.825 kg을 넣고 3배 가수하여 60 ℃에서 용해시킨 뒤, 정백당 22.9 kg, 물엿 18.2 kg을 넣고 115 ℃에서 가열한 후 잘 섞이도록 혼합하였음..
- (4) 부원료 혼합탱크는 젤라틴이 굳지 않도록 40 ℃로 유지하고 액상 젤리 베이스를 이동시킨뒤, 백장미 꽃잎 추출물, 천연 오렌지향, 구연산, 천연비타민 등을 혼합하였음.
- (5) 혼합이 완료된 젤리 베이스는 80 ℃에서 농축하여, 수분함량 25 %로 조절한 뒤, 농축된 액상 젤리 베이스를 곰 모양의 실리콘 틀에 부어 건조하였음.
- (6) 건조실에서 1일간 건조 후 MCT오일을 발라 몰드에서 젤리를 떼어낸 뒤, 다시 2일간 건조를 통해 완성하였음.

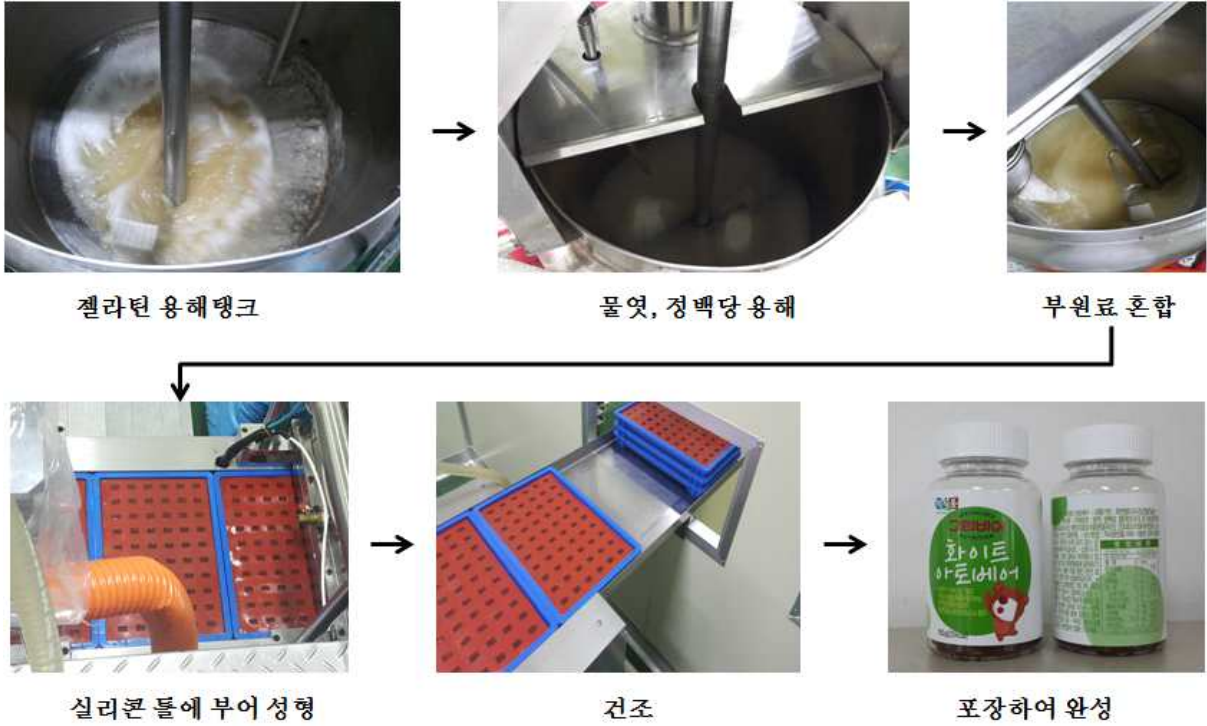


그림 148. 화이트 아도베어 제조 공정



그림 137. 화이트 아도베어 시생산 제품

마. 시생산 제품의 품질규격 검사

(1) 아웃도어 프로테인 워터

(가) 본 제품은 식품공전상 규격 외 일반 가공품 중 기타가공품으로 분류되며 성상은 미백색의 분말로 규격은 다음 표를 따름.

(나) 아웃도어 프로테인 워터의 gallic acid 함량의 범위는 사용한 백장미 꽃잎 추출물의 gallic acid 함량의 80~120% 범위로 설정하였으며, 그 값은 72.755 mg/kg - 109.133

mg/kg 로 설정하였음.

표 86. 기타 가공품의 제품 규격

항목	기준	제품 분석 결과
성상	이미, 이취가 없으며 색상변화가 없다.	적합
이물	식품에 위해를 끼치는 이물이 없어야 한다.	적합
대장균군	음성	적합
지표성분	gallic acid로서 72.755 mg/kg - 109.133 mg/kg	96.95 mg/kg 적합

(2) 소아 아토피 환자용 젤리

- (가) 본 제품은 식품공전상 과자류의 캔디로 분류되며 곰 인형 모양의 구미젤리로 규격은 다음표를 따름.
- (나) 소아 아토피 환자용 젤리의 gallic acid 함량의 범위는 사용한 백장미 꽃잎 추출물의 gallic acid 함량의 80~120 % 범위로 설정하였으며, 그 값은 125.528 mg/kg - 188.292 mg/kg 로 설정하였음.

표 87. 캔디류의 제품 규격

항목	기준	제품 분석 결과
성상	고유의 향미를 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.	적합
허용 외 타르색소	검출되어서는 아니된다.	적합
세균수	1 g 당 10,000이하	적합
납	1.0 이하(mg/kg)	적합
지표성분	gallic acid로서 125.528 mg/kg - 188.292 mg/kg	185.81 mg/kg 적합

(3) 제품 안정성 모니터링을 위한 지표성분 함량 변화 분석

- (가) 백장미 꽃잎 추출물이 가지는 피부건강 기능성분인 백장미 꽃잎 추출물의 함유량을 확인하기 위하여 보관조건 및 기간에 따른 백장미 꽃잎 추출물의 지표성분인 gallic acid 함량 변화를 3가지 온도 조건에서 저장 실험을 통하여 확인하였음.
- (나) 저장실험은 25 °C, 35 °C, 45 °C 3가지 조건에서 제품을 저장하며 1주일 간격으로 분석하였으며, HPLC를 이용하여 gallic acid 함량을 확인하였음.

표 88. 시생산 제품 지표성분 모니터링

(단위 : mg/kg)

제품	보관 온도	0주차	1주차	2주차	3주차	4주차	5주차	6주차	7주차	8주차
화이트 액티브 워터	25℃	96.95	84.83	74.5	79.07	82.53	80.13	81.28	81.44	80.73
	35℃	96.95	74.4	78.92	86.73	86.57	82.79	84.16	83.58	82.99
	45℃	96.95	75.07	74.79	83.99	76.31	74.15	77.52	76.46	75.1
화이트 아토베어	25℃	185.81	187.12	159.37	172	179.31	161.52	168.43	170.22	167.59
	35℃	185.81	178.03	166.7	172.5	185.11	176.56	180.55	169.97	174.22
	45℃	185.81	171.95	179.63	179.74	181.08	168.11	169.15	172.38	171.77

- (다) 소아 아토피 환자용 젤리의 gallic acid 함량은 모니터링 기간 동안 3가지 온도 조건에서 모두 범위 내 함량을 유지하고 있는 것으로 분석됨.
- (라) 아웃도어 프로테인 워터의 gallic acid 함량은 보관 전 0주차의 gallic acid 함량보다는 다소 낮아진 결과를 보이기는 했으나 모두 범위 내 함량을 유지하고 있는 것으로 분석됨.
- (마) 소아 아토피 환자용 젤리와 아웃도어 프로테인 워터 제품은 모두 상온 유통제품으로 유통조건인 15~25 ℃보다 가혹조건인 35 ℃와 45 ℃의 조건에서 보관한 제품에서도 지표성분의 변화가 거의 없음을 확인하였으며, 이를 통하여 두 제품 모두 온도 변화에 대하여 안정적이라고 할 수 있음.

바. 시생산 제품의 관능평가

- (1) 시생산 제품의 관능검사는 실제 소비층을 대상인 불특정 인원에 대하여 관능 및 제품에 대한 종합적인 만족도를 확인하기 위하여 관능검사 전문기관인 센소메트릭스에서 시행하였음.
- (2) 아웃도어 프로테인 워터 관능평가
 - (가) 평가 대상 패널은 20~40세 남녀를 대상으로 온라인 사전 설문을 통해 음료 제품의 음용 경험을 확인하여, 단백질 음료나 스포츠 이온음료를 주 1회 이상 음용하는 소비자 68명을 선정하였음.
 - (나) 센소메트릭스 관능검사 센터에서 평가가 진행되었으며, 제품의 맛을 평가하기 전, 제품의 컨셉 설명을 보고 컨셉에 대한 만족도, 독창성, 구매의지를 5점 척도를 활용하여 평가하였음.
 - (다) 제품의 맛을 보고 종합기호와 전체적인 향미, 단맛, 신맛, 식감, 뒷맛 기호의 기호도 평가는 9점 척도를 사용하여 평가하였음.

표 89. 컨셉 만족도(5점 척도)

	평균(5점 척도)	Bottom Boxes ¹⁾	Top Boxes
컨셉 만족도	3.71	17.6%	75.0%

¹⁾ Bottom Boxes: 제시 컨셉에 대해 “마음에 들지 않는다” 이하(1~2점) 응답 비율 (%)
 Top Boxes: “마음에 든다” 이상(4~5점) 응답 비율 (%)

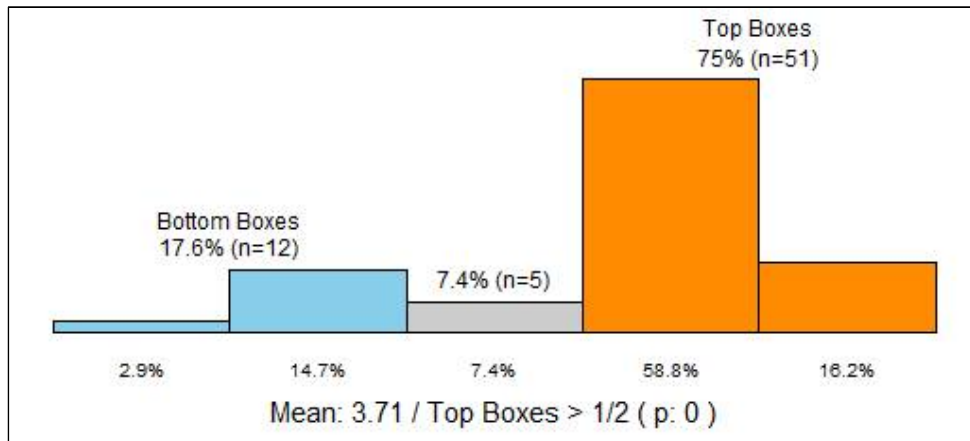


그림 138. 컨셉 만족도 - 구간별 응답 빈도

(라) 컨셉이 새롭고 독창적이냐는 질문에 대해 “새롭고 독창적이다”이상의 top boxes비율 (66.2 %)이, “새롭고 독창적이지 않다”이하의 bottom boxes 비율(23.5 %)보다 뚜렷하게 높아 제시 컨셉이 새롭고 독창적이라고 인식하는 것으로 평가되었음.

표 90. 종합 기호

시료	종합기호 평균(9점 척도)	Bottom 3 ¹⁾	Mid 3	Top 3
프로테인워터	5.81	23.5 %	22.1 %	54.4 %

¹⁾ Bottom 3: 종합기호의 “싫다” 이하(1~3점) 응답 비율 (%)
 Mid 3: 종합기호의 “보통수준”(4~6점) 응답 비율 (%)
 Top 3: 종합기호의 “좋다” 이상(7~9점) 응답 비율 (%)

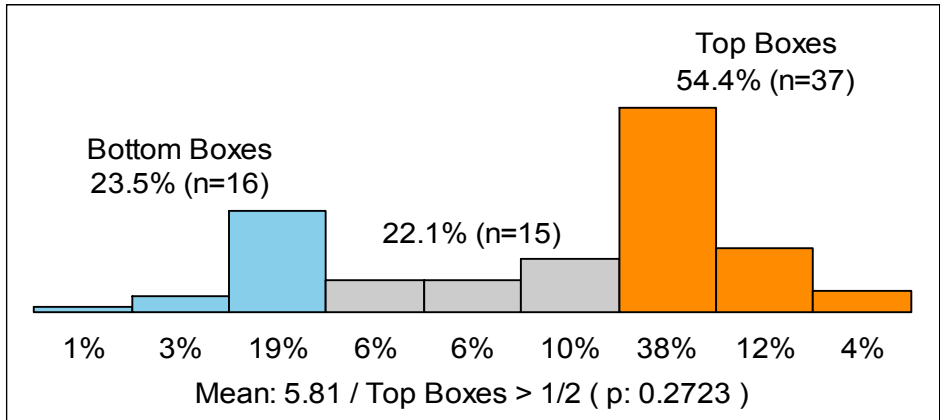


그림 139. 종합기호 - 구간별 응답 빈도

(마) 프로테인워터의 종합기호 평균은 5.81이며, 종합기호에 대해 “좋다” 이상의 긍정반응 (Top 3)은 54.4 %로 “싫다” 이하의 부정반응(Bottom 3, 23.5 %)보다 높게 나타나 프로테인워터에 대한 종합만족도는 상당히 높은 수준으로 나타났음.

표 91. 시료 별 세부 기호 분석

	평균	Bottom 3 ¹⁾	Mid 3	Top 3
향미기호	5.53	26.5 %	22.1 %	51.5 %
단맛	6.28	14.7 %	26.5 %	58.8 %
신맛	5.97	20.6 %	22.1 %	57.4 %
식감	5.81	19.1 %	32.4 %	48.5 %
뒷맛	5.16	36.8 %	23.5 %	39.7 %

¹⁾ Bottom 3: 종합기호의 “싫다” 이하(1~3점) 응답 비율 (%)

Mid 3: 종합기호의 “보통수준”(4~6점) 응답 비율 (%)

Top 3: 종합기호의 “좋다” 이상(7~9점) 응답 비율 (%)

(바) 향미기호, 단맛, 식감, 뒷맛의 평균은 상당히 높은 것으로 평가되었음.

표 92. 맛 구매의지(5점 척도)

	평균(5점 척도)	Bottom Boxes ¹⁾	Top Boxes
맛 구매의지	3.16	36.8 %	52.9 %

¹⁾ Bottom Boxes: 제시 컨셉에 대해 “구매하고 싶지 않다” 이하(1~2점) 응답 비율 (%)

Top Boxes: “구매하고 싶다” 이상(4~5점) 응답 비율 (%)

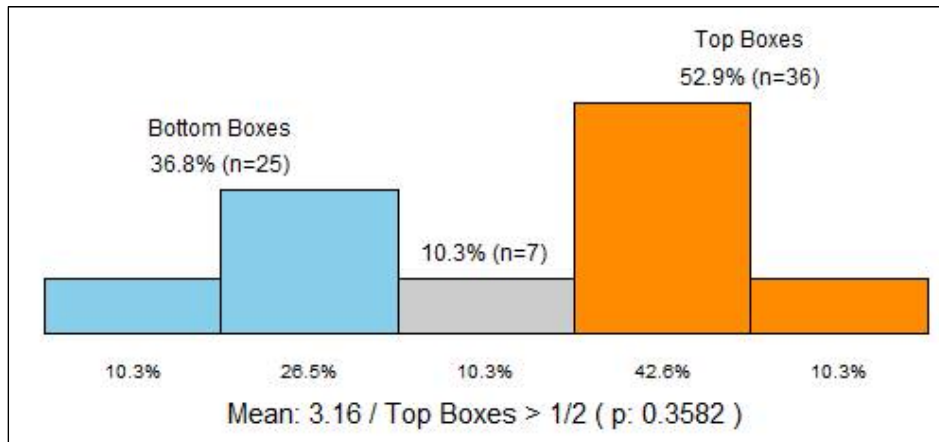


그림 140. 맛 구매 의지 - 구간별 응답 빈도

(사) 프로테인워터의 맛에 대한 구매의지 평균은 3.16으로, 평가자의 52.9 %는 구매하고 싶은 것으로, 36.8 %는 구매하고 싶지 않은 것으로 평가되어, 긍정반응이 상대적으로 높게 나타났음.

(아) 단백질 음료나 스포츠 이온음료를 주 1회 이상 음용하는 20~40대 남녀 대상으로 프로테인워터 제품은 종합기호 평균이 5.81(9점 척도)로 긍정반응(Top3 응답 비율)이 51.5 %로 뚜렷하지는 않지만 상당히 높은 수준으로 나타났고, 전반적인 향미, 단맛, 신맛, 식감 등의 세부 속성에 대해서도 상당히 높은 만족도를 보여, 프로테인워터 제품의 관능품질은 양호한 수준인 것으로 판단됨. 제품의 단맛과 목넘김의 부드러움은 현재 강도가 제품에 적정한 수준이라고 평가되었지만, 짠맛과 쓴맛은 현재 강도보다 약하게, 레몬맛의 경우 현재 수준보다 더 강하게 변경되기를 바라는 것으로 나타남. 평가자들은 제시한 컨셉을 확실히 새롭고 독창적이라고 평가하였고, 컨셉 구매의지 또한 뚜렷하게 높아 컨셉에 대해서 뚜렷하게 만족하는 것으로 판단됨. 제품을 맛본 후 구매의지와 맛과 컨셉을 고려한 종합구매의지는 보통 수준 이상의 긍정반응을 나타냈음. 제품의 쓴맛 특성을 개선한다면 맛에 대한 소비자 경쟁력 강화에 긍정적 영향을 끼칠 것으로 판단됨. 그러나 전반적인 맛 품질이 양호한 수준이므로 특성개선을 하지 않은 경우라도 지속적인 경험 (섭취 노출) 기회가 수반된다면 소비자의 긍정반응이 보다 강해질 수 있다고 보여짐.

(3) 소아 아토피 환자용 젤리 관능평가

(가) 평가 대상 패널은 5~10세 남/녀 어린이를 대상으로 평소 젤리를 싫어하지 않으며, 월1회 이상 젤리를 섭취하는 44명(남성22명, 여성22명)을 선정하였음.

(나) 센소메트릭스 관능검사 센터에서 보호자와 함께 방문하여 평가가 진행되었으며, 어린이평가는 종합기호, 세부 기호(모양, 색깔, 맛, 단맛, 신맛), 재섭취의지, 선호 특성/비선호 특성, 부모권유섭취의지에 대해 평가하였으며, 보호자에게는 컨셉을 제공하여 컨셉에 대한 평가(컨셉만족도, 컨셉독창성, 컨셉구매의지) 및 최종구매의지(컨셉과 어린이의 섭취반응을 고려)에 대해 평가를 하였음.

표 93. 종합 기호

시료	평균 ¹⁾	Top 3	Mid 3	Bottom 3	유의확률 (Top3>50%)
구미젤리	7.57	84.1 %	9.1 %	6.8 %	< 0.05

¹⁾ 평균 : 9점 척도로 5점이 보통.

Top 3 box: 종합기호의 “좋다” 이상(7~9점) 응답 비율 (%)

Mid 3 box: 종합기호의 “보통수준”(4~6점) 응답 비율 (%)

Bottom 3 box: 종합기호의 “싫다” 이하(1~3점) 응답 비율 (%)

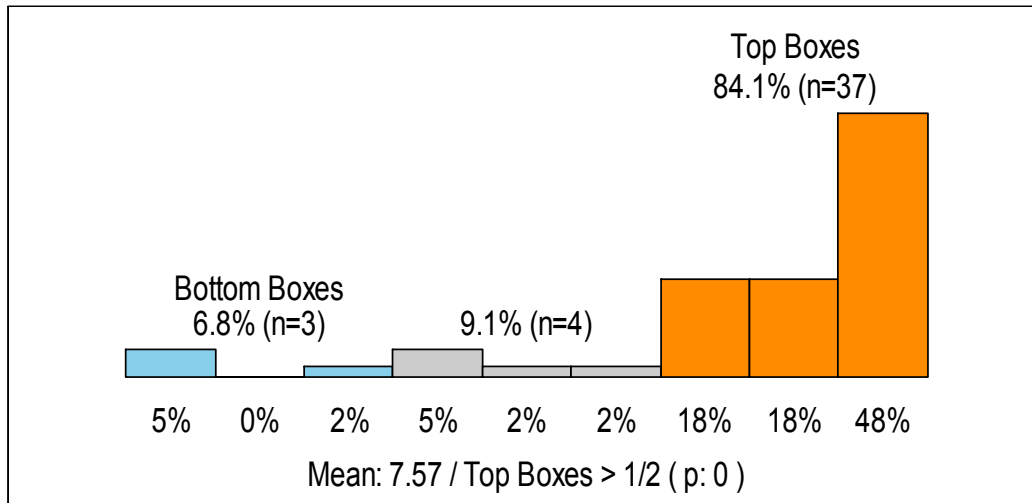


그림 141. 종합 만족도 점수 분포

(다) 구미젤리의 종합기호 평균은 7.57이며, Top3 응답 비율이 84.1 %로 유의확률(Top3 > 50 %)로 볼 때 긍정반응이 뚜렷하게 높은 것으로 평가되었음.

표 94. 시료 별 세부 기호 분석

	모양	색깔	맛	단맛	신맛
평균 ¹⁾	7.84	6.50	6.66	6.75	5.73
Top 3	81.8 %	54.6 %	68.1 %	68.2 %	43.2 %
유의확률 (Top3>50%)	< 0.05	-	< 0.05	< 0.05	-

¹⁾ 평균 : 9점 척도로 5점이 보통.

Top 3: 7~9점 응답 비율 (%)

(라) 모양, 전반적인 맛, 단맛에 대한 평균은 긍정반응이 뚜렷한 것으로 평가되었으며, 색깔과 신맛에 대한 기호는 긍정적이나 유의차는 없는 것으로 나타났음.

표 95. 재섭취 의지 및 부모권유 섭취 의지

	평균 ¹⁾	Top 2	Bottom 2	유의확률 (Top2>50%)
재섭취의지	3.80	70.5 %	15.9 %	< 0.05
부모권유 섭취의지	3.86	72.7 %	11.4%	< 0.05

¹⁾ 평균 : 5점 척도로 3점이 보통.
 Top 2: 4, 5점 응답 비율 (%)
 Bottom 2: 1, 2점 응답 비율 (%)

(마) 재 섭취의지의 평균은 3.80이며, Top2 응답 비율이 70.5 %로 긍정반응이 뚜렷하게 높은 것으로 평가되었으며, 부모권유섭취의지의 평균은 3.86이며, Top2 응답 비율이 72.7 %로 긍정반응이 뚜렷하게 높은 것으로 평가되었음.

(바) 5-10세 남녀 어린이 대상으로 구미젤리 제품은 종합기호 평균이 7.57(9점 척도)로 긍정반응(Top3 응답 비율)이 84.1 %로 뚜렷하게 높게 나타났고, 세부 속성에서도 모양 7.84(Top3 81.8 %) 및 6.66(Top3 68.1 %), 단맛 6.75(Top3 68.2 %)로 뚜렷한 긍정 반응을 보여 구미젤리의 관능품질 경쟁력은 우수한 것으로 판단됨. 섭취한 후 확인한 재섭취의지 또한 긍정반응이 뚜렷한 것으로 확인되었음. 선호 특성으로 “말랑말랑하다”, “쫄득쫄득하다”의 선택이 높고, 비선호 특성으로 “단단하다”, “탱탱하다”, “쫄득하지 않다”의 선택이 낮아 제품의 물성에 대해서는 만족하는 수준인 것으로 판단된다. 보호자 대상으로 확인한 컨셉(컨셉만족도, 컨셉독창성, 컨셉구매의지) 및 최종구매의지(컨셉및 아이들의 섭취반응)에 대해서 뚜렷하게 긍정적인 것으로 확인되었음.

8절 백장미 추출물을 이용한 고부가가치 와인 개발

1. 백장미 장미 추출물 유래 파이토케미칼(phytochemical)을 첨가한 와인 제조 및 관능 품질 평가

가. 백장미 추출물을 이용한 와인제조

(1) 백장미 추출물을 이용한 와인을 제조하기 위해 Cambell early 포도를 이용하여 red wine과 welch's 포도 음료를 이용하여 white wine을 제조 한 후 0.1 %, 0.25 % 백장미 추출물을 첨가하여 37 °C에서 14일 간 발효를 진행하여 각 와인을 제조하였음.

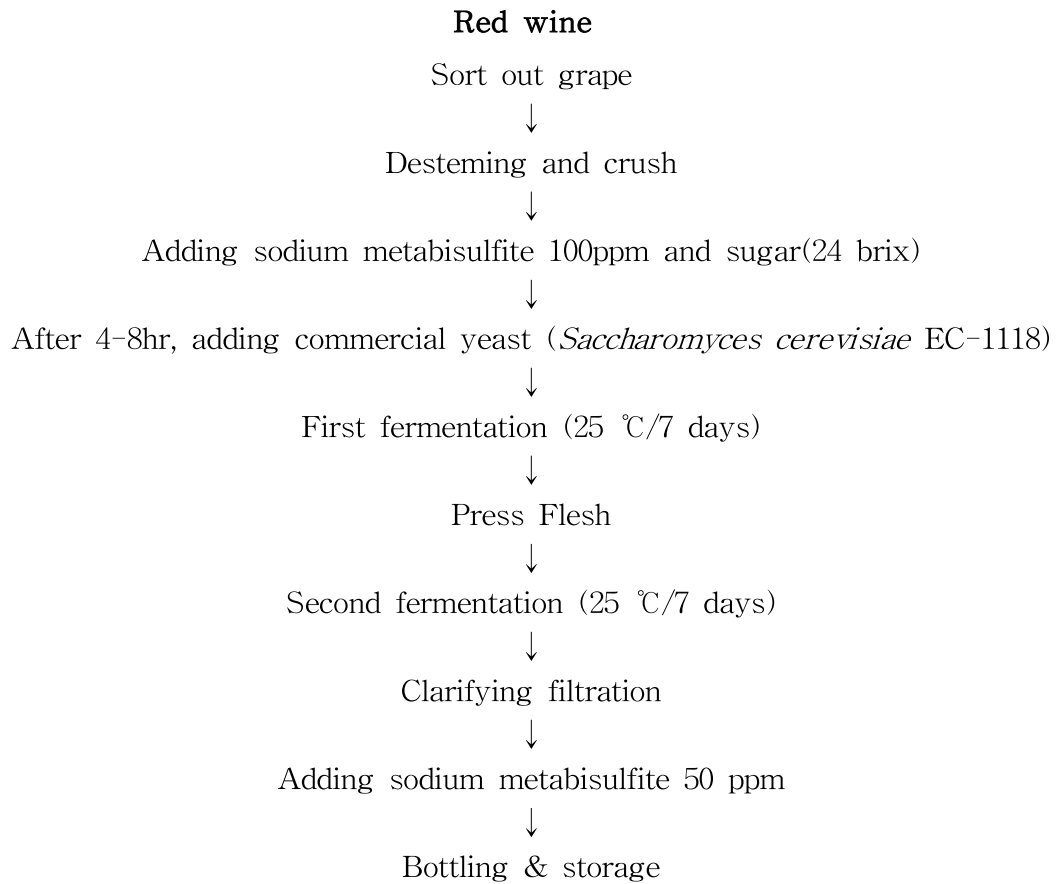


Fig 142. Fermentation scheme for red wine



파쇄



제경



보당 및 효모첨가



25°C, 14일간 발효



병입

그림 143. 레드와인 제조 공정

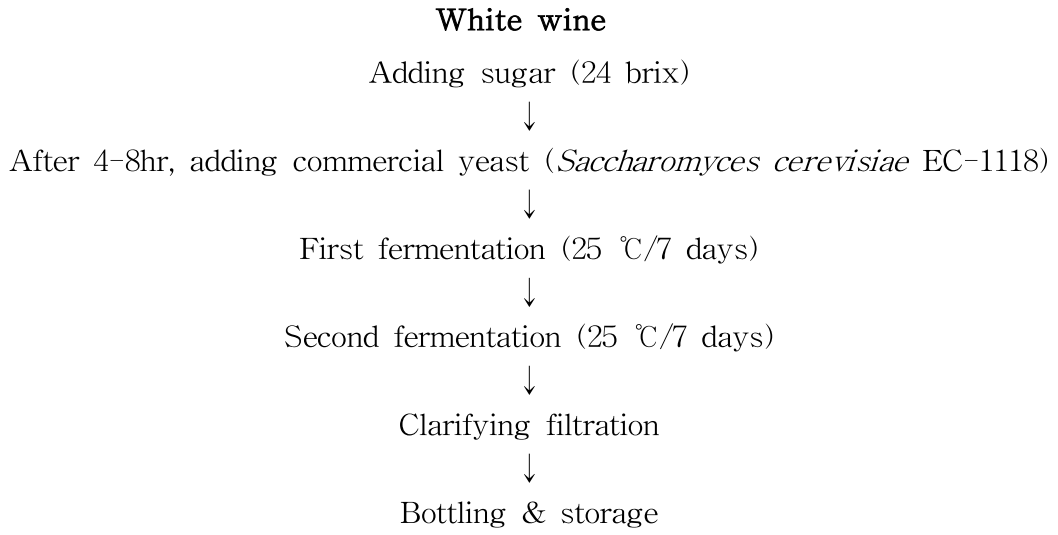


Fig 144. Fermentation scheme for White wine

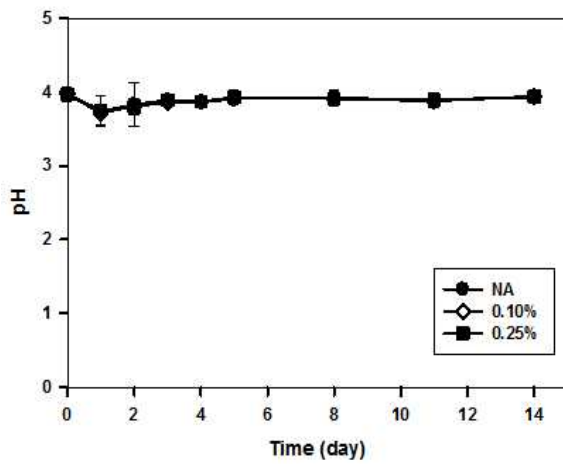


그림 145. 화이트 와인 제조 공정

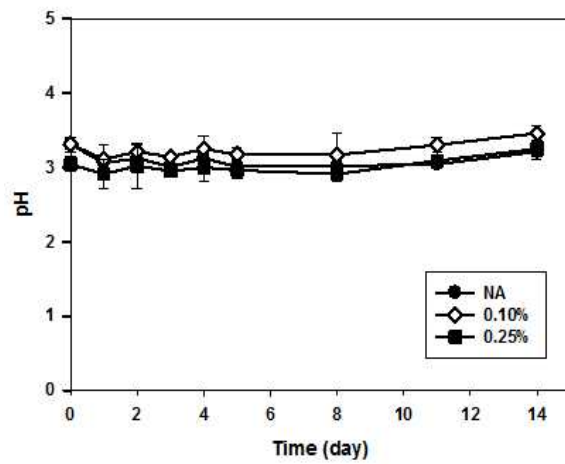
나. 알코올 농도, Brix, pH, gas production 변화에 따른 와인 내 백장미 추출물의 발효 저해 확인

(1) 와인 내 백장미 추출물의 발효 저해 효과를 확인하기 위해 발효 진행 중 14일 간 Brix, pH, gas production, 알코올 농도를 측정된 결과 모두 유의적 차이를 보이지 않아 백장미 추출물에 의한 발효의 저해는 일어나지 않았음.

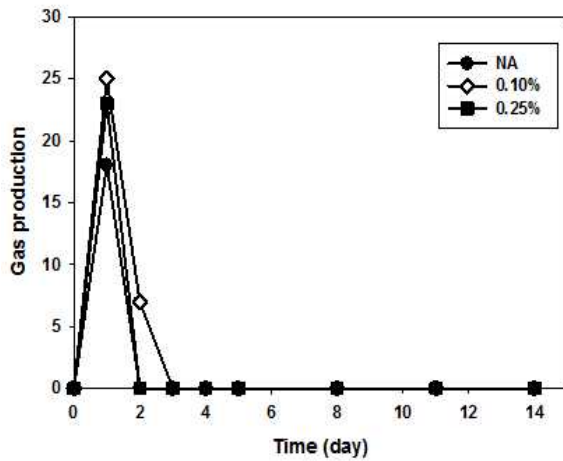
pH (red wine)



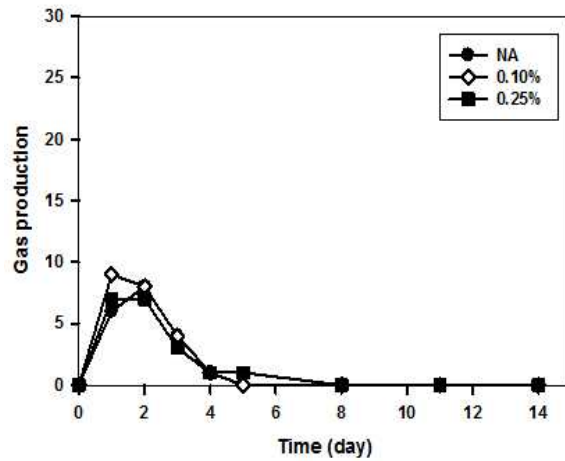
pH (white wine)



Gas production (red wine)



Gas production (white wine)



Brix (red wine)

Brix (white wine)

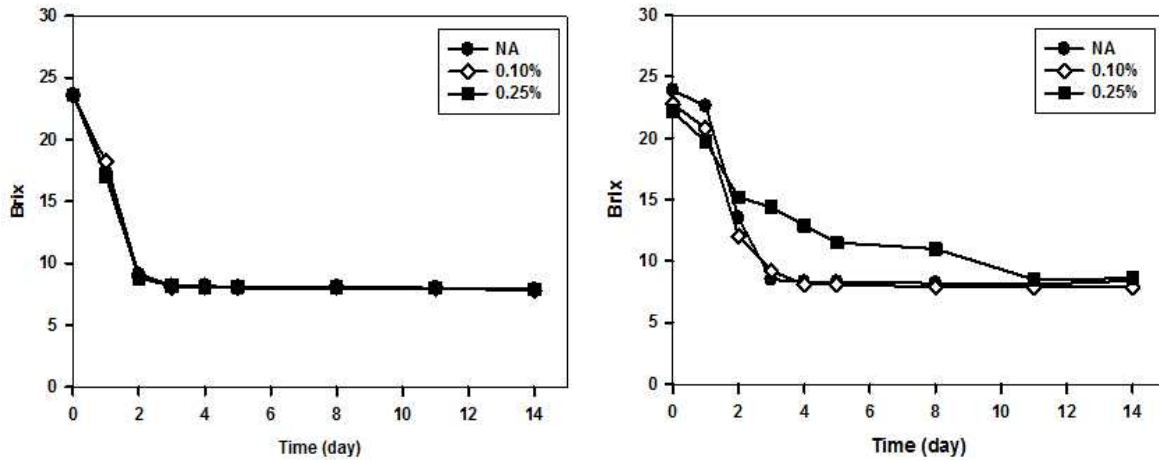


Fig 146. Change of pH, °Brix, gas production in wines containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %).

Table 96. Alcohol concentration in wines containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %)

WRPE concentration in wine (%)	Alcohol concentration (%)	
	Red wine	White wine
NA	15.0	14.0
0.10	13.5	14.5
0.25	14.0	14.0

다. 백장미 추출물 장 건강 와인의 색도 및 관능 품질 평가

(1) 백장미 추출물 첨가에 따른 관능적 변화를 보기위해 색도계를 이용하여 색도측정 및 9점 척도법을 이용한 관능 평가를 진행하였음. 그 결과, 색도는 red wine에서 적색도 변화를 white wine에서는 황색도의 변화가 일어났고 이는 발효 기간 중 알코올 생성에 의해 백장미 추출물의 용해율이 증가에 따른 결과임. 관능평가 결과, 색도의 변화로 white wine의 색에 대한 기호도가 낮아 졌으나 백장미 추출물에 의해 쓴맛이 강화됨으로써 관능적 기호도를 상승 시켰음. 이 결과로 백장미 추출물에 의해 유의적인 관능 변화는 없음을 알 수 있었음.

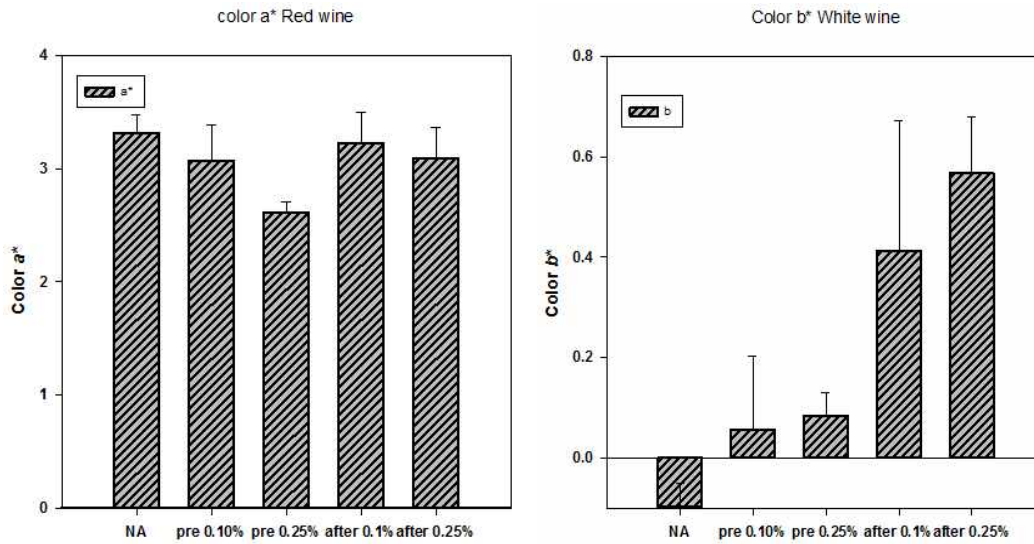


Fig 147. Colorimetric test of wines containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %).

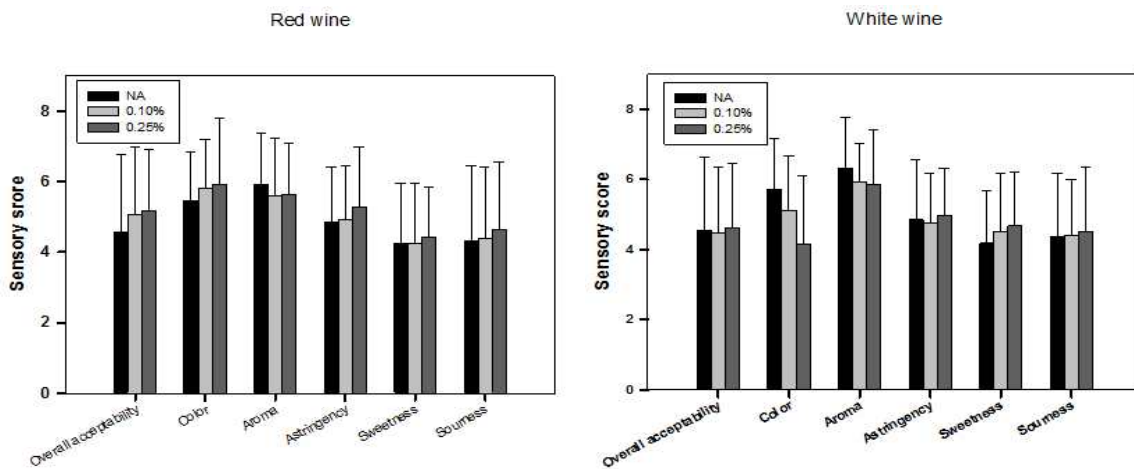


Fig 148. Scores of sensory test of wines containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %).

2. 기능성 성분의 와인 내 stability 분석 및 항산화 효과 분석

가. DPPH assay, ABTS assay, Total polyphenol contents 분석을 통한 항산화 효과 확인

- (1) 백장미 추출물을 첨가한 와인의 항산화력 증가를 알아보기 위해 DPPH assay, ABTS assay와 Total polyphenol contents 분석을 실시하였음. 그 결과, DPPH assay에서는 발효가 진행됨에 따라 농도 의존적으로 항산화력이 높아지는 것을 알 수 있었고, 발효 7일차 보다 14일 차에서 항산화력의 차이가 더 높아지는 것을 통해 알코올 농도가 높아짐에 따라 백장미 추출물의 용해율이 높아져 항산화력에 미치는 영향이 더 높은 것으로 나타남. ABTS assay에서는 white wine에서 농도 의존적으로 항산화력이 증가함을 보였고 red wine에서는 유의적인 변화가 없는 것으로 나타남. 이는 red wine

제조 시 첨가되는 과피에서 white wine보다 많은 phenolic compounds의 생성에 의해 항산화력이 강화되어 차이를 볼 수 없을 것임을 나타냄. Total polyphenol contents 결과 또한 red wine에서는 백장미 추출물의 농도별로 차이 값이 나타났지만 white wine에서 보다 폭 넓은 차이를 보임. 이 결과 백장미 추출물을 첨가하였을 때 white wine에서 항산화활성이 효과적으로 증가함을 알 수 있었음.

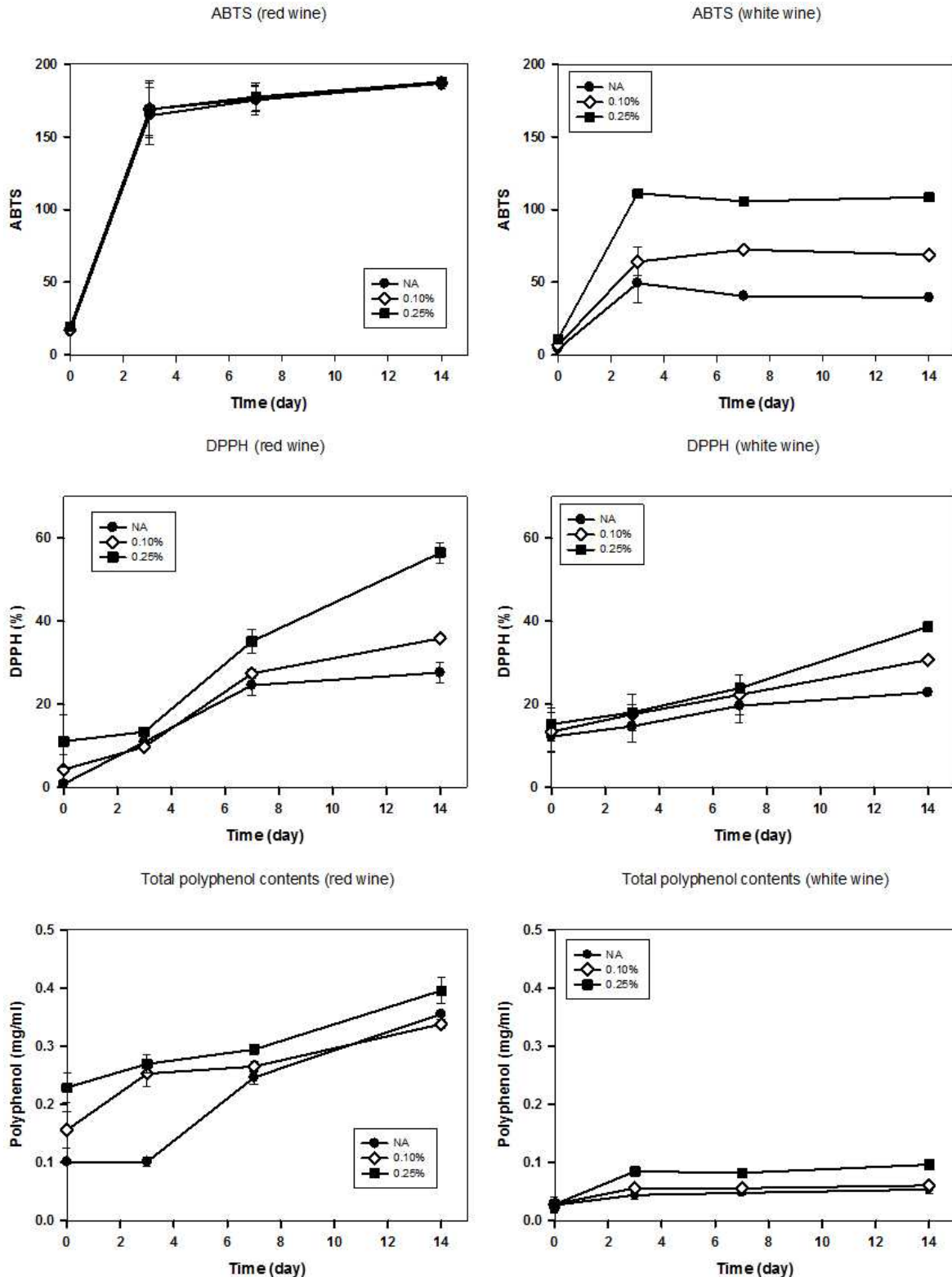


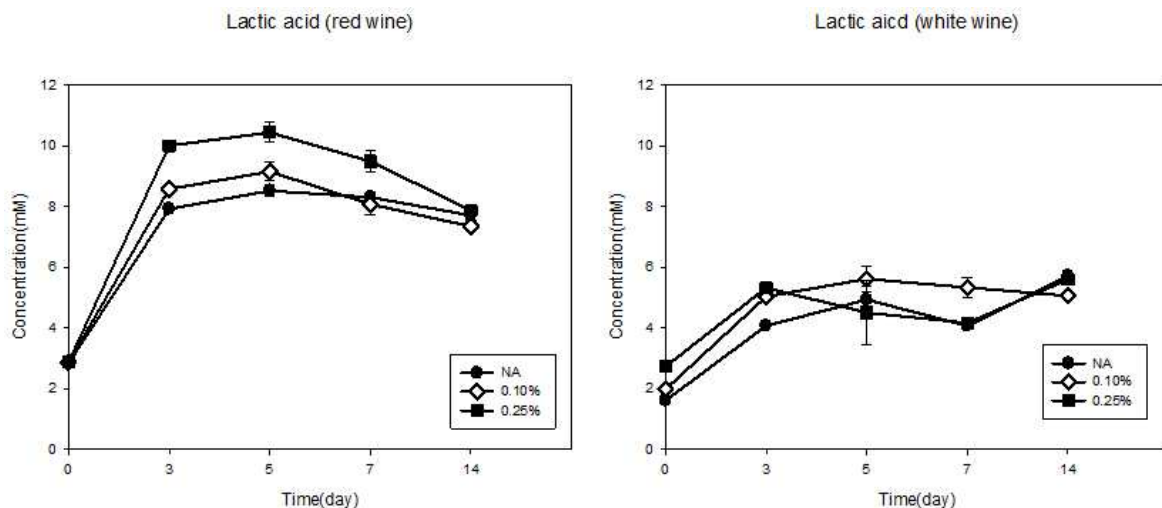
Fig 149. Change of anti-oxidation activity in wines containing WRPE
(0 %, 0.1 %, and 0.25 %).

나. Organic acid 정량 분석

(1) 발효가 진행됨에 따라 생성되는 SCFA를 확인하기 위해 발효 진행 0일, 3일, 5일, 7일, 14일 차의 와인 샘플을 HPLC를 이용하여 wine의 주 SCFA인 lactic acid와 malic acid를 정량 분석하였음. Red wine에서 백장미 추출물을 첨가함에 따라 농도 의존적으로 lactic acid의 변화량이 증가하는 것을 알 수 있으며 white wine 보다 많은 양이 생성되었음. 또한 malic acid의 함량이 red wine에서 백장미 추출물을 첨가하지 않은 wine에 비해 증가하였음.

Table 97 HPLC analysis condition for organic acid

HPLC	Agilent 1260 Infinity
Column	BIO-RAD HPX-87H
Mobile phase	0.008N sulfuric acid
Run time	30 min
Injection volume	25 μ l
Wave length	215 nm
Flow rate	0.6 ml/min



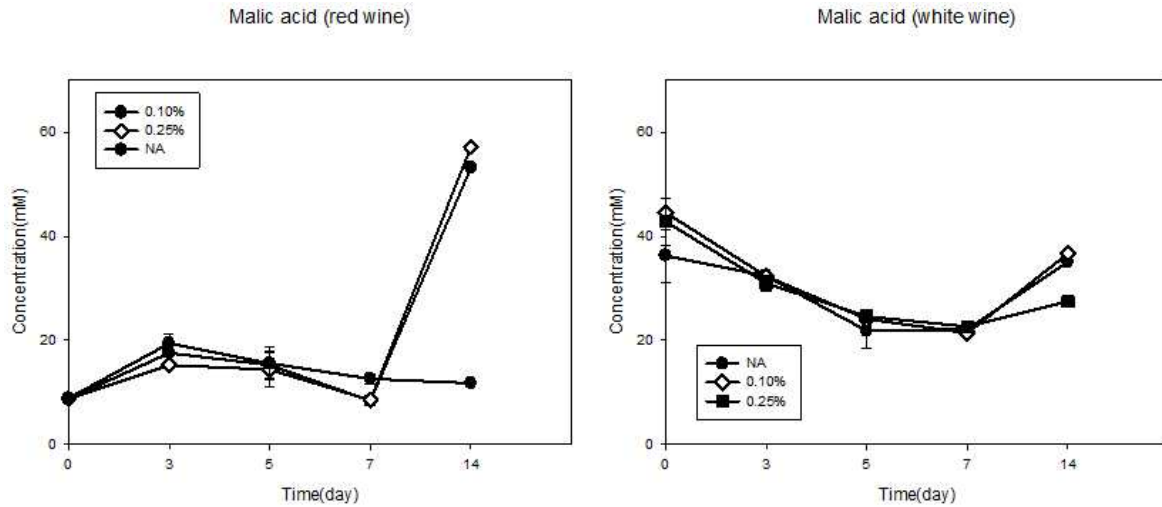


Fig 150. Change of malic acid and lactic acid in wines containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %).

다. 백장미 추출물 내 주요 파이토 케미칼 인 gallic acid의 와인 내 stability 확인

(1) 백장미 추출물 내 gallic acid를 정량하기 위해 HPLC를 이용해 분석한 결과, red wine에서 gallic acid가 발효가 진행됨에 따라 증가하였음. 무첨가 와인에 비해 0.1 %, 0.25 % WRPE 첨가와인의 gallic acid 생성량이 많았고 이는 와인 발효 시 과피에서 부터 생성된 gallic acid라 생각됨. White wine에서는 발효 0일차와 발효가 끝난 후 유의적 차이를 볼 수 없었는데 이는 과피가 첨가 되지 않는 white wine의 특성상 처음 넣어준 WRPE에 존재하는 gallic acid의 양을 그대로 유지하는 것으로 생각됨.

Table 98. HPLC analysis condition for gallic acid

HPLC	Agilent 1260 Infinity		
Column	ZORBAX SB-C18		
Mobile phase	A : water/85 % <i>o</i> -phosphoric acid(99.5/0.5 v/v) B : acetonitrile/water/85 % <i>o</i> -phosphoric acid (50/49.5/0.5 v/v/v)		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	90	10
	5.0	90	10
	33.0	18	82
	33.1	90	10
Run time	38 min		
Injection volume	25 μ l		
Wave length	255 nm		
Flow rate	1 ml/min		
Column temperature	22 $^{\circ}$ C		

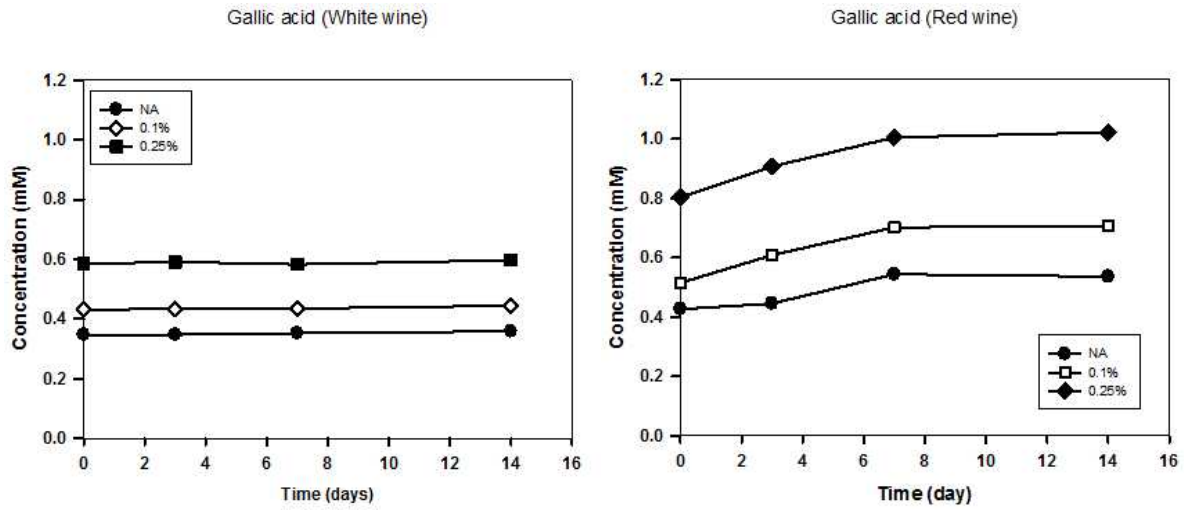


Fig 151. Change of gallic acid in wines containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %).

3. 기능성 와인의 *Anti-Helicobacter* 효과 분석

가. Agar plate diffusion method를 이용한 *Anti-Helicobacter* 효과 분석

(1) 백장미 추출물을 첨가한 wine의 anti-helicobacter 효과를 분석하기 위해 *Helicobacter pylori*를 도말한 agar plate를 이용하여 diffusion method로 각각 생성된 clear zone의 크기를 측정하였음. Positive control로는 *Helicobacter pylori* 치료제로 알려져 있는 tetracycline 0.1 %를 사용하여 각 샘플과 비교하였음. 그 결과, red wine에서는 clear zone이 생성 되지 않았으며 tetracycline의 clear zone은 1.7 cm정도로 측정되었고 white wine에서도 1.3 cm정도로 tetracycline의 74 %의 clear zone이 관찰되었음.

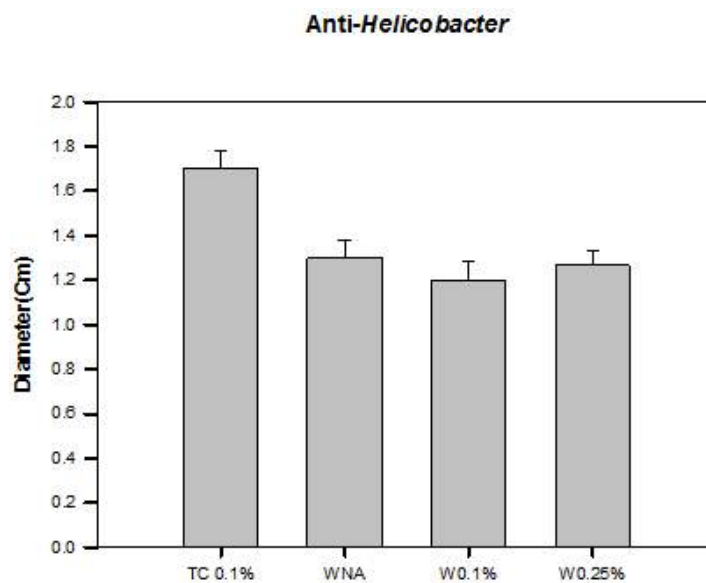


Fig 152. *Anti-Helicobacter* activity of white wine containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %) tested by agar well diffusion method.

나. *Helicobacter pylori* growth graph 변화를 이용한 Anti-*Helicobacter* 효과 분석

(1) 백장미 추출물을 첨가한 wine의 anti-helicobacter 효과를 분석하기 위해 *Helicobacter pylori*를 접종한 BHI broth (added 10 % FBS)에 각 wine sample을 10 % 씩 첨가한 후 spectrophotometer을 이용하여 600 nm에서 O.D값을 측정하였음. 그 결과, red wine에서는 wine sample을 첨가해주지 않은 control에 비해 큰 변화량이 없었지만 white wine에서는 백장미 추출물의 농도 의존적으로 최고 control과 비교했을 때, 66 %까지 *Helicobacter pylori*의 생육이 저해되었음.

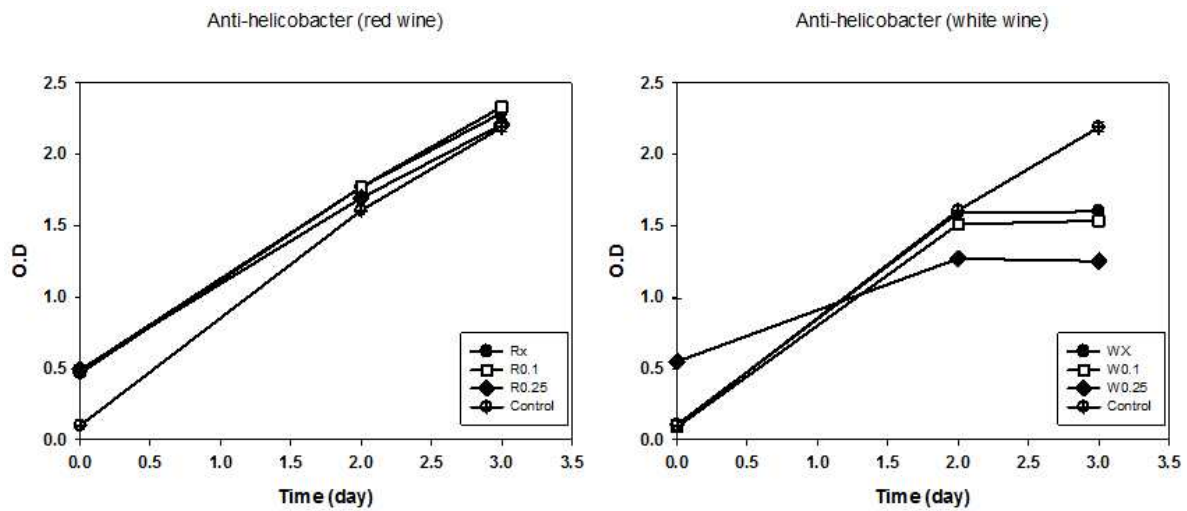


Fig 153. Anti-*Helicobacter* activity of wines containing WRPE (0 %, 0.1 %, and 0.25 %) tested by optical density during broth culture.

4. 고찰

가. WRPE를 첨가함에 따라 와인의 기능성 효과 향상을 위해 백장미 추출물을 첨가하여 red wine과 white wine을 각각 제조 하여 이를 분석하였다. 발효 결과 pH 와 Brix, gas production의 변화를 비교 하였을 때 백장미 추출물은 첨가한 농도에 관계없이 red wine과 white wine의 발효를 저해 시키지 않았다. 레드 와인에서는 DPPH 라디칼 소거능에서 백장미 추출물의 농도 의존적으로 항산화능이 증가하는 것을 볼 수 있었고 화이트 와인에서는 DPPH, ABTS, total polyphenol 모두 백장미 추출물의 농도 의존적으로 항산화능을 증가 시켰다. 이는 이전에 수행된 장미의 phenolic compound 함량에 따른 항산화능 증가 연구 (Nilgün Göktürk Baydar, 2012)와 유의하게 장미의 gallic acid, rosmarinic acid, carnosik acid, quercetin, leteolin, rutin과 같은 phenolics 나 flavanoids에 의해 항산화능이 증가하는 것으로 생각 할 수 있다.

나. 그 중 gallic acid 는 WRPE의 중요한 phytochemical 로써 특히 화이트 와인의 부족한 항산화능을 증가 시켰다. *H. pylori* 저해능 실험에서는 white wine이 백장미 추출물의 농도 의존적으로 *H. pylori*를 저해하였는데 이는 백장미 추출물의 antimicrobial

activity 효과에 관한 연구(Dongsun Park, 2016)와 유의한 결과를 보였으며 백장미 추출물이 wine 발효 후에도 *H. pylori* 저해능을 보이는 것을 확인 하였다. 또한 WRPE를 와인에 첨가하였을 때 관능적 저하를 보이지 않았다. 장미 꽃잎을 첨가한 차(Yakov Vinokur, 2006)의 경우, 장미에서 유래한 이취가 발생하여 기호도가 감소한 것과 비교했을 때, 본 연구의 결과는 장미를 추출하여 첨가 해줌으로써 쓴 맛 증가가 낮았고 이취의 증가를 방지한 것으로 판단된다. 또한 앞 선 연구에서 밝혀졌듯 장미는 건강식품으로 잘 알려진 녹차 보다 높은 항산화력을 지니고 있어 기능성을 높게 향상 시켰다고 할 수 있다.

다. 현재 한국의 와인시장은 증가하고 있으며 이에 따른 소비자의 니즈도 관능적 기호도가 높은 와인만이 아닌 건강을 고려한 구매로 이어지고 있다. 이를 고려한다면 polyphenol 함량이 낮은 campbell early 품종으로 제조한 레드 와인이나 화이트 와인은 장기적으로 경쟁력이 낮은 품종으로 판단 될 수 있다. 하지만, 본 실험에서 시도하였듯이 높은 항산화 능력과 각종 건강 기능성을 가진 백장미 추출물은 campbell early 포도품종의 단점을 보완할 수 있는 좋은 소재임을 확인하였다. 따라서, 본 연구는 국내 와인 시장의 증가와 더불어 국산 와인의 경쟁력을 증가 시킬 수 있고 기능성 소재를 첨가한 발효식품 연구에도 좋은 예로 이용 될 수 있을 것이다.

9절 결과 종합 분석 및 고찰

1. 백장미 기능성 성분의 추출기술 및 최적화

가. 백장미 꽃잎으로부터 기능성분 추출은 열수 추출, 에탄올(EtOH) 추출, 고온가압 추출, 효소처리 추출, 초임계 유체 추출 방법을 이용. 각각 추출법의 효율은 식물 유래의 생리활성물질로 알려진 폴리페놀 화합물의 함유량을 측정하여 비교하였음. 각 추출 방법 중 **에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 가장 높았고 그 다음으로 고온가압 추출물이었으며, 세 번째로 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량이 높았음.**

나. 추출효율 비교를 통하여 최종적으로 최적화 연구 및 최적 추출조건 확립 연구를 진행할 추출법으로 에탄올 추출법과 열수 추출법을 선정하였음. 에탄올 추출법은 폴리페놀 추출 효율이 가장 높았기 때문에 선정되었고, 고온가압 추출법의 효율이 두 번째로 좋았으나, 본 연구과제의 목적인 기술 실용화에 있어서 대량생산 적용 및 생산 경제성 평가가 열수 추출법이 더욱 우수하므로 두 번째 추출방법으로 열수 추출법을 선정하였음.

다. 에탄올 추출법의 최적화는 반응표면분석법(response surface methodolgy, RSM)으로 추출조건에 따른 추출특성을 연구하고 수율을 최적화하여 최적점을 찾을 수 있었으며, **폴리페놀이 함유된 고행분 추출 수율을 15 %에서 40 %까지 증대시킨 성과를 얻을 수 있었음.** 열수 추출법은 추출효율에 영향을 줄 수 있는 인자인 pH, 샘플 입자 크기, 추출 시간을 선정하여 폴리페놀, 플라보노이드, 항산화능에 대한 최적 조건을 확립

하였음.

2. 백장미 추출물의 성분 동정 및 지표 물질 선정

- 가. 식용백장미추출물에서 피부에 체내 생리활성과 피부미용에 기능성 있다고 알려진 성분을 확인하고 스크린하기 위해 비타민과 폴리페놀 성분분석 진행하였으며, 폴리페놀 성분을 정성분석 진행하여 표준물질과 머무름 시간(RT) 및 UV 스펙트럼이 일치하는 gallic acid, astragalol, kaempferol성분의 피크를 확인. kaempferol은 Ethanol 추출물에서만 확인되어 열수보다는 Ethanol에서 잘 추출되는 것으로 확인하였음.
- 나. 식용백장미추출물의 성분 동정 및 지표 물질 선정을 위해 자유라디칼 소거능, protein degradation 보호능, tyrosinase 억제능, elastase 억제능, 세포 활성 시험, NO 제거능, 항산화 유전자 활성 수준 시험 등을 수행하여 biological activity가 가장 높은 후보 물질을 선정하였음. 피부 개선에 긍정적인 효과를 기대하기 위해서는 기본적으로 항산화 효능에 대한 검증이 이루어져야 하며, 이를 위해 에탄올 추출물을 시작물질로 하여 에틸아세테이트, 부탄올, 클로로포름 및 물 분획물 높은 항산화 효과를 확인한 결과 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에서 우수한 생물활성이 관찰되었음. 또한, 미백 효과에 대한 기본적인 검증 방법인 tyrosinase 억제능을 확인한 결과에서도 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에서 유의한 억제 효능이 확인되어 미백 기능에 효과적인 물질이 함유되어 있는 것으로 판단하였음.
- 다. 특히 1차적인 activity screening에서 상대적으로 가장 높은 활성을 보인 에틸아세테이트 분획물을 대상으로 2차 분획을 실시하여 각 분획물에 함유되어 있는 생리활성능을 비교한 결과 분획물 F4가 가장 뛰어난 효과를 보이는 것으로 나타남. 한편, 이러한 높은 효능실험결과와 GC-MS를 통한 성분분석 결과 부탄올과 에틸아세테이트 분획물에서 공통적으로 높은 수준의 indole이 포함되어 있음을 확인하였고, 이 성분은 에틸아세테이트 분획물 유래의 2차 컬럼 분획물 F1-F4 중 효능이 가장 높게 나타난 F4에 약 73 %가 포함되어있는 것으로 분석되어 주요한 유효물질 및 지표물질로서 적합한 대상이 될 것으로 판단하였음.
- 라. 지표물질의 선정을 위하여 지표물질로 판단되는 indole을 가장 많이 함유하고 있는 2차 컬럼 분획물 F4로부터 산·염기 추출법을 적용하여 역추출에 의한 분리를 진행하였음. 역 추출한 시료를 silica gel chromatography를 수행하여 분획을 실시하였고 GC/MS 분석과 NMR분석을 통하여 gallic acid가 함유된 복합물임을 확인하였음. Recycling preparative HPLC 및 NMR분석을 통해 최종적으로 백장미 추출물에 gallic acid가 고농도로 함유되어 있는 gallic acid complex를 확인하였음.
- 마. 대표 지표물질로 선정된 gallic acid는 오배자(gallnut), 포도, 딸기, 파인애플, 바나나, 레몬, 호두, 녹차, 망고 등 다양한 식물에 함유되어 있는 대표적인 항산화 물질이며 항암, 항염, 항진균, 항당뇨, 혈압조절, 항간질 등의 효과가 알려지기도 하였음. 또한, 기존 연구에 따르면 백장미 꽃잎의 항산화 효능에 중요한 역할을 하는 물질로 gallic acid를 제시하기도 하였음(Park *et al.*, 2009).
- 바. 본 연구에서도 다른 분획물들에 비해 gallic acid complex와 ethyl acetate 분획물이 높은 피부기능성 효능을 갖는 것으로 나타났을 뿐만 아니라 분획물 중 가장 높은 gallic acid 비율을 보이는 분획물 F4의 경우 모든 생리활성 시험에서 가장 높은 효능을 보였음. 따라서 gallic acid는 대표적인 지표물질이면서 유효물질인 것으로 판단됨.

바. 한편, 별도의 추출과정을 거친 gallic acid complex 보다 F4가 높은 효능을 보인 것은 분획물 내에 함유되어 있는 다른 유효물질들과 상승효과가 나타났기 때문으로 판단됨.

사. 결론적으로, 백장미 꽃잎 내의 지표물질은 gallic acid로 선정되었으며, 유효물질은 gallic acid, pyrogallol, γ -sitosterol, butanoic acid로 추측되며, 백장미 꽃잎 추출물 및 분획물에서 관찰되는 피부기능성 효능은 이상의 지표물질 및 유효물질들에 의한 종합적인 상승효과로 판단됨.

3. 백장미 추출물을 이용한 피부미용 기능성 확인

가. 백장미 추출물의 피부미용 기능성 탐색을 위하여 *in vitro* 수준에서 DPPH-scavenging assay, Protein degradation assay, Lipid peroxidation assay, NO-scavenging assay, Gene expression of antioxidant and inflammatory enzymes 등의 방법을 통하여 항산화 효능 및 항염증 평가를 진행하였으나, 향후 제품 출시단계에서 백장미의 기능성 홍보를 위한 세포에서 항산화 효능을 측정하여 보완할 예정.

나. 본 연구에서는 인위적으로 자외선을 조사하여 피부 주름을 유발시킨 hairless 마우스에 백장미 추출물을 투여하여 주름개선 효과를 제시하고자 하였음. 시험은 정상군과 UVB 유발군, 백장미 EtOH 추출물 저(60mg/kg)·고(300mg/kg)농도군, 열수(HW) 추출물 저(60mg/kg)·고(300mg/kg)농도군을 두고, UV 조사 전 4주와 조사 후 10주까지 하루 1회씩 14주간 경구로 반복 투여하였으며, 주름을 유발하기 위하여 주 3회 10주간 시행함. 그 결과 UVB 유발군에서는 주름증가가 현저하게 관찰된 반면 EtOH 고농도군과 HW 저농도군에서는 주름증가가 감소된 것으로 나타남. 그러나 이러한 결과는 replica의 image analyzer 분석평가에서는 반대되는 양상으로 관찰됨. 유발군의 주름정도가 정상군에 비해 유의적이지 않았으며, 오히려 EtOH 고농도군과 HW 저농도군에서 주름 정도가 심한 것으로 나타남. 이 결과는 육안관찰평가는 등쪽 전체의 주름에 대해 평가하는 반면, replica를 채취하는 부위는 등쪽 중앙부분에 한정된 것에 의한 것으로 유발군의 경우 등쪽 중앙부위보다 측면부위에 주름이 더 많이 유발되어 있고, 중앙부위의 피부가 매우 두터워진 것에 의한 것이라 생각되어 짐. 피부조직의 병리학적 검사결과 유발군의 표피층에 비해 EtOH 고농도군과 HW 저농도군의 표피층 두께가 다소 얇아져 있었던 점과 collagen이 증가된 점, 변성된 탄력섬유의 양에 대해 EtOH 고농도 및 HW 저·고농도군에서 유의적으로 감소된 것, 피부 조직에 대한 collagenase 및 MMP-1 분석 결과 EtOH 고농도 및 HW 저·고농도군이 정상군보다도 낮은 수치를 나타낸 점들을 종합하면, 백장미 추출물은 collagen의 증가보다는 elastase를 효과적으로 억제함으로써 주름개선에 효과를 주는 것으로 사료되며, 그 효과는 EtOH 고농도 > HW 고농도 > HW 저농도 > EtOH 저농도 순으로 우수한 것으로 나타남.

다. 피부 보습 효능 평가는 표피장벽의 붕괴와 더불어 ceramide 함량을 감소시키기 위해 4주간 UV 조사시킨 후, 마지막 조사 다음날 수분손실량(TEWL)을 측정하여 평가하였음. 수분손실량(TEWL) 수치는 피부로부터 발산되는 수분량으로서 이 수치가 높을수록 피부의 보습 기능이 떨어져 있음을 의미하며, 동시에 피부 고유의 장벽 기능이 손상되었음을 알 수 있음. TWEL 수치 측정 결과 정상군과 UVB 유발군에서 유의적 차이가 나타나지 않았는데, 이는 동물 입수상의 문제로 뒤늦게 입수된 정상군의 등피부에 충분한 양의 vehicle이 도포되지 못한 것과 시간상의 이유로 단축되었던 4주간의

유발이 문제가 되었던 것으로 판단됨. 그럼에도 불구하고 EtOH 고농도 군에서는 유의적으로 TEWL 수치가 낮게 나타남으로써 보습 기능이 향상되는 있는 것이 확인됨. 또한 ceramide 생합성 효소인 SPTLC2 유전자 발현정도에서작게나마 다른 군에 비해서는 발현량이 증가된 것으로 나타남으로써 **백장미 EtOH 추출물 고농도군에서 보습효과의 가능성을 확인함.**

- 라. 미백 성분이 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기속도결정단계에 관여하는 효소인 tyrosinase를 억제하는 작용기전이 있어, 백장미 추출물에 대해 *in vitro* tyrosinase 활성 억제시험을 실시함. 그 결과 백장미 EtOH 추출물이 적은 용량에서도 유의한 저해능을 보임에 따라 높은 생리활성을 가지는 것으로 나타남. 이에 *in vivo*에서 미백효과를 측정하기 위해서 백장미 추출물을 Brown guinea pig에 도포하고, DBA2 마우스에 도포 및 경구투여한 결과 미백효과가 우수한 것으로 나타남. 비록 조직학적 검사에서는 melanin content 수치가 육안관찰 결과와 다소 상이하게 나타났으나 이는 도포에서와는 달리 경구에서는 색소 침착 부위가 부분적으로 달리 나타난 점과 개체차가 심했던 것에 따른 것이라 생각됨. EtOH 추출물에서 농도의존적으로 미백 효과가 커진 것과 HW 추출물에서 농도가 높을수록 개체차가 적다는 점으로 미루어보아 백장미 추출물의 섭취 기간이 길수록 미백효과 및 개체차는 적어질 것으로 생각됨. Brown guinea pig(도포) 및 DBA2 마우스(도포와 경구)에서의 결과를 종합하면, **백장미 추출물은 UV의 조사에 의해 유발된 색소침착을 효과적으로 억제하며, HW 추출물보다는 EtOH 추출물이 더욱 높은 미백효과를 가지고 있으며, 이러한 효과는 장기간의 섭취로 더욱 증대시킬 수 있음이 확인됨.**
- 마. 아토피 피부염은 주된 증상으로 피부발진과 가려움증을 호소하며, 대부분 유소아기에 발생하는 염증성 피부질환임. 이러한 아토피 피부염을 치료하기 위한 다양한 의학적 접근이 시도되어 왔으며, 이중 약물치료법으로 항히스타민제, 면역억제제, 항생제, 스테로이드제 등이 주로 사용되어 왔음. 그러나 장기간 치료 시 부작용과 내성이 문제가 되어 최근에는 천연물 유래 치료제 개발에 대한 높은 관심이 대두되고 있음.
- 바. 본 연구팀은 이전의 연구에서 백장미 fraction 추출물이 급성 알러지 반응에 대해 효과가 있음을 확인한 바 있어 본 연구에서는 이번 연구에서 개발된 백장미 추출물을 이용하여 compound 48/80을 이용한 급성 알러지 반응 및 DNFB를 이용한 만성 알러지 반응을 유도한 마우스에 백장미 추출물을 투여하여 아토피개선 효과를 제시하고자 하였음.
- 사. 전신성 알러지 쇼크반응 (active systemic anaphylaxis, ASA)에 대한 백장미 추출물 효과를 조사하기 위하여 compound 48/80에 의해 유도되는 anaphylaxis 모델을 사용하여 개선효과를 평가한 결과 알러지 반응 유도 경로(복강내 투여)와 같은 경로로 백장미 추출물을 투여했을 때 백장미 EtOH 추출물 투여군은 3 mg/kg 이상의 농도부터 10% 이하의 낮은 치사율을 보이고 HW 추출물 투여군 역시 3 mg/kg 이상의 농도부터 20% 이하의 낮은 치사율을 보이는 것을 확인함. 시험물질 투여경로만을 임상예정 경로인 경구로 변경한 실험에서도 EtOH 추출물과 HW 추출물에서 80%미만의 치사율을 확인함으로써 급성 알러지 반응에 백장미 추출물 개선효과의 가능성을 확인함.
- 아. 국소성 급성 알러지 반응에서의 개선효과를 평가하기 위해 4주간 백장미 추출물을 투여하고 마지막 투여 30분 후 mast cell degranulator인 compound 48/80을 피내로 주사하고 60분간 scratching behaviors을 측정한 결과, 백장미 EtOH 추출물이 C48/80

유발에 따른 가려움증을 감소시켜줌을 확인함. 또한 국소성 알러지 유발 피부 조직을 적출하여 Evan's blue를 정량하여 부종 완화 효능을 평가하여 HW 추출물보다는 EtOH 추출물이 부종 완화에 더 우수한 것을 확인하였음.

자. BALB/C 마우스에 DNFB를 사용한 만성 아토피 피부염에 백장미 추출물을 적용 할 때의 개선효과를 평가함. DNFB의 반복 도포로 농양성 염증, 출혈 및 가피탈피 등의 피부염이 관찰되어 적용된 모델이 아토피 피부염 개선효능 평가에 적합함 확인함. 이러한 증상에 대해 백장미 EtOH 추출물과 HW 추출물 모두 고농도에서 증상이 개선 되는 것으로 나타남. 조직병리학적 검사에서도 DNFB 유발군에서는 만성 아토피 피부염에서 관찰되는 표피두께의 증가(피부 조직의 비후)가 나타나는데 반해 백장미 추출물을 투여한 모든 군이 유의하게 피부의 두께가 얇아져 있는 것을 확인함. 알러지 반응을 일으키는 과정에서 중요한 역할을 하는 비만세포의 탈과립(mast cell degranulation) 정도를 분석하기 위해 피부조직내 탈과립형 비만세포의 수를 측정 한 결과에서도 DNFB 유발군에서는 표피 밑으로 다량의 탈과립형 비만세포가 침착된 것에 반해 백장미 추출물 투여군은 모두 유의하게 감소함을 보여주어 백장미 추출물이 아토피 피부염 개선에 효과적인 물질임을 확인함. 아토피 피부염의 지표로도 사용되고 있는 IgE는 혈청 내 존재하는 IgE가 비만세포와 결합하여 세포를 활성화시켜 염증을 일으키는 것으로 알려져 있음. 본 연구에서는 DNFB의 유발로 IgE증가뿐만 아니라 eosinophiis 증가, IgE를 유도하는 cytokines IL-4, IL-6가 증가됨을 확인하였으며, 이러한 증상들을 백장미 추출물이 탁월하게 감소시키는 것으로 나타났으며 EtOH 추출물의 경우 저농도와 고농도의 차이가 크지 않은 것으로 미루어보아 일정농도 이상에서는 개선 효과를 가진다는 것과 HW 추출물의 경우 농도의존적으로 개선효과를 가지며, HW 고농도의 경우 염증과 관련된 지표(mast cell, IgE, IL-4 및 IL-6)에서는 EtOH 추출물보다도 더 뛰어난 것을 확인함. 따라서 백장미 추출물은 알러지 반응을 감소시켜 주는 효능이 있으며 만성 아토피 피부염에 대해서는 EtOH 추출물과 HW 추출물 모두 뛰어난 효과를 가지는 것으로 확인됨. 다른 연구결과들을 고려하면 이러한 효과는 장기간의 섭취로 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 사료됨.

4. 백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발과 장내 미생물에 미치는 영향

가. 미생물을 이용한 기능성 성분 강화 기술연구 진행을 위하여 활성미생물과 그와 관련된 미생물 stock을 *in-silico* 분석을 통한 활성 유전자 검색 및 활성 확인을 통해 공시 균주 확보하였음. 식물유래 성분인 rutin과 gallic acid를 각각 quercetin과 pyrogallol로 전환시키는 균주를 선발하기 위해 선택배지와 RAPD PCR 방법을 이용하여 균주를 선발하였으며 rutin을 quercetin으로 전환시키는 균주는 *E. hirae*로 동정. rutin을 전환시키는 *E. hirae*가 다른 종류의 flavonoid glycosides의 전환 유무를 조사한 결과 keampferol-o-3-rutinoside는 keampferol로 전환됨을 확인하였음.

나. 백장미 추출물의 기능성 강화 및 피부미용 기능성과 더불어 장내 세균에 미치는 영향 및 prebiotics로서 활용 가능성에 대하여 평가를 진행하였음. 먼저 기능성 강화에서는 지표물질 시 확인연구 과정에서도 밝혔듯이 지표성분인 gallic acid에 부가되어 높은 피부미용 기능성을 갖는 pyrogallol로 전환하여 기능성을 강화하고자 하였으며, *in*

silico 분석을 이용하여 phenolic acid decarboxylase가 있는 10개의 균주를 선발하였고, 공시 균주의 PAD 활성을 측정한 결과 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104 균주가 PAD 활성이 가장 높게 측정되어 백장미 생물 전환 균주로 선정하였음. *Lactobacillus plantarum* 은 대표적인 유산균으로 장내 유익균으로 알려진 미생물임. Lab scale에서 백장미 추출물을 이용한 gallic acid의 bioconversion 실험을 진행하였고 12시간동안 *L. plantarum*에 의한 gallic acid의 pyrogallol 전환률은 75.25 %로 확인되었음

다. Bioconversion에 대하여 pilot scale로 scale up 연구 역시 진행하였는데 Lab scale보다는 더딘 전환속도를 보였으나 24시간 후에 gallic acid의 약 70%가 pyrogallol로 전환되어 대량 생산 가능성에 대해서도 확인할 수 있었음.

라. 백장미 추출물이 장내 미생물에 미치는 영향 평가를 통하여 항균활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었는데 이는 지표성분인 gallic acid와 pyrogallol을 다량 함유하고 있는데서 기인함을 알 수 있었음. 더불어 대장 시뮬레이션을 통한 백장미 추출물 발효 연구 결과 24시간 후에 *Lactobacillus* sp.의 성장을 증진시켰으며, 배양 12시간부터 lactate 생성량을 증가시켰으며 24시간 최종 lactate 양은 대조군의 4배로 생성량이 증가된 것을 확인하였음.

5. 피부미용 기능성분 추출공정 최적화 및 대량생산 기술 개발

가. 식품소재생산을 위한 대량생산 기술 연구를 수행하였으며, 추출공정의 scale up연구를 위하여 pilot scale의 추출조건 적용 및 동결건조, 분무건조 조건 확립 연구를 진행하였고, 지표성분인 gallic acid에 대한 분석을 진행하였음. 에탄올 추출조건에서는 75 °C 3시간 추출에서 가장 높은 폴리페놀 수율을 얻을 수 있었으며, 그 중 gallic acid 함량은 31,727 mg/kg으로 약 3 %의 고농도로 존재함을 확인하였음.

나. pilot scale 조건 적용을 통하여 백장미 추출물의 생산용 추출 조건을 설정한 뒤, 생산 규모 추출(2,000 L) 공정에 적용하였고, 에탄올 추출 및 동결건조를 통하여 기능성분을 함유한 백장미 추출물을 생산하였으며, 원물 대비 건조물 수율은 약 27%로, 폴리페놀 함량 수율에서는 Lab scale과 동일한 수준임을 확인하였음.

다. 제품 적용 및 판매 가격 결정을 위하여 경제성 평가를 진행하였고 제조원가 기준 에탄올 추출물은 136만원/kg, 열수 추출물 99만원/kg의 가격으로 산정하였음

6. 이너뷰티 기능성 식품개발

가. 백장미 추출물의 피부미용 기능성을 보다 편리하고 간편하게 섭취할 수 있으며, 보다 큰 경제적 성과를 창출할 수 있는 제품을 개발하기 위하여 **모두 4가지의 적용 제품에 대하여 개발을 진행하였음.**

나. 백장미 추출물의 피부미용 기능성은 총 4가지로 피부보습, 미백, 주름개선, 아토피 개선이며, 장내 미생물에 미치는 영향 평가를 통해 장건강 기능성을 확인하였음. 이러한 특징을 담아 제품을 기획, 설계하였고, 피부노화(주름개선, 보습)예방을 위한 항노화 영양음료, 피부미백 효과를 더한 아웃도어 프로테인 워터, 소아 아토피 환자를 위한 젤리 제품, 피부건강을 위한 갱년기 여성용 두유에 대한 개발을 진행하였음.

다. 백장미 추출물의 섭취량을 결정하기 위하여 *in vivo* 실험에 사용한 동물 섭취량으로 체표면적을 기준으로 한 외삽법을 이용하여 섭취량을 결정하였음. 고농도(동물 실험 -

에탄올 추출물 300 mg/kg) 기준 섭취량은 70 kg 성인이 하루 1.7 g의 백장미 추출물을 섭취하여야 하며, 저농도(동물실험 - 에탄올 추출물 60 mg/kg) 기준 섭취량은 70 kg 성인이 하루에 340 mg의 백장미 추출물을 섭취해야 본 연구에서 확인한 기능성을 기대할 수 있음.

- 라. 제품 컨셉에 대한 소비자 수용도 조사를 하기 위하여 (주)마크로밀 엠브레인을 통해 진행하였고 각 제품의 컨셉에 대한 만족도 및 제품의 구입의향에 대하여 확인 하였음. 설문조사 결과를 통해 일부 컨셉을 수정하거나 추후 제품 개발에 있어 보완해야 할 점에 대해서 확인하였음. 대부분 설문조사 결과 백장미 추출물이 가지는 피부 미용 기능성에 대하여 의심을 하고 있었으며, 이는 추후 관련 연구 결과를 가지고 홍보에 집중에 해야 할 필요성을 확인하였음.
- 마. 피부미용 기능성 식품 레시피 및 공정개발은 각 제품의 컨셉 및 유형에 맞추어 개발 하였음. 항노화 영양음료는 아침 대용식으로 활용하기 위하여 열량 밀도를 1 kcal /ml로 설계하였으며, 근감소증 예방을 위하여 단백질 함량은 12 g / can으로 설계하였음. 갱년기 여성용 두유는 기존 두유의 레시피와 다르게 기능성 원료인 백장미 꽃잎 추출물과 볶은대두배아분말 등이 함유되었으며, 배아 특유의 쓴맛을 제거할 수 있도록 감미도를 조절하여 레시피를 개발하였음. 아웃도어 프로테인 워터는 단백질 합성에 최적화된 영양 비율로 설계하였으며, 소아 아토피 환자용 젤리는 레시피 개발 단계에 있어 구미젤리 형태의 구현을 위하여 젤리 base에 백장미 추출물 함량을 조절하는 등의 물성구현 연구를 통해 레시피를 개발하였음. 공정규격은 lab 제조 단계와 시생산을 고려하여 설계하였음. 또한, lab에서 개발/제조된 제품은 관능평가를 통하여 관능 개발 및 개선을 진행하였음
- 바. 개발된 제품의 시생산을 위하여 제품의 관능만족도, 경제성, 시생산 가능성, 사업화 가능성 등을 모두 고려하여 평가한 결과 아웃도어 프로테인 워터와 소아 아토피 환자용 젤리가 선정되었음. 이 제품들을 선정하는 과정에서 원재료비에서 차지하는 백장미 추출물의 단가가 가장 많은 영향을 끼쳤으며, 유통단계 및 제품 가격대에 비해서 백장미 추출물의 가격이 높게 형성되어 있어 수용하기 어려운 부분으로 작용하였음.
- 사. 제품의 네이밍은 연구단 내에서 자체적으로 제안/평가하여 아웃도어 프로테인 워터는 ‘화이트 액티브 워터’, 소아 아토피 환자용 젤리는 ‘화이트 아토피어’로 결정되었음. 디자인은 전문 디자인 업체에 의뢰하여 제작하였음.
- 아. ‘화이트 액티브 워터’는 (주)코스맥스바이오에서 생산하였으며, ‘화이트 아토피어’는 (주)남양F&B에서 각각 생산하였음. 생산 제품의 규격은 식품공전을 따랐으며 생산된 제품은 모두 규격에 적합하였음. 제품 제조에 생산된 백장미 추출물의 함량은 기준 함량의 80~120%로 설계하였으며, ‘화이트 액티브 워터’는 72.755 mg/kg - 109.133 mg/kg, 그리고 ‘화이트 아토피어’는 125.528 mg/kg - 188.292 mg/kg로 설계하였음. 생산 제품들은 본 규격범위에 적합한 gallic acid 함량을 가지고 있었으며, 저장 중 gallic acid의 안정성을 확인하기 위하여 25, 35, 45 °C 3가지 온도 조건에서 저장하며 1주일마다 gallic acid를 분석하였음. 그 결과, 두 제품 모두 온도저장에 대하여 안정함을 보여주었음
- 자. 시생산 제품의 외부 관능검사는 관능검사 전문 기관인 (주)센소메트릭스에서 진행하였음. 아웃도어 프로테인 워터는 20~40세 남녀를 68명을 대상으로 평가진행하였고 종합기호에 대한 평균은 5.81점(9점척도)로 종합기호에 대해 “좋다”이상의 긍정반응은 54.5

%로 나타나 상당히 높은 종합 만족도를 보임. 소아 아토피 환자용 젤리는 5~10세 어린이를 44명을 대상으로 평가하였고, 종합기호 평균은 7.57(9점척도)이며, “좋다”이상의 긍정반응은 84.1 %로 긍정반응이 뚜렷하게 나타남. 두 제품 모두 긍정적인 관능결과를 나타내었음.

차. 향후 제품 출시단계에서 백장미 꽃잎 추출물의 유무에 따른 관능 평가를 진행하여 제품 홍보 자료로서 활용을 검토.

카. **시생산 제품을 종합적으로 평가해볼 때, 백장미 꽃잎 추출물의 기능성 및 안정성을 평가하기 위한 지표성분 함량이 품질규격에 적합하였고 외부관능검사 결과 관능 만족도 및 구매의향이 높게 나타났음.** 프로테인 워터 시장은 미국을 중심으로 발전해왔으나, 국내에서도 최근 프로테인 워터가 출시되기 시작하였으며, 아토피 환자용 젤리는 아직 국내외에서 찾아볼 수는 없지만 비타민 젤리, 오메가3 젤리 등 각종 건강기능성 젤리 제품이 약국을 중심으로 판매되고 있음. **백장미 꽃잎 추출물의 기능성에 대하여 소비자들의 의심도가 높게 나타났지만 기능성에 대하여 홍보계획을 수립하고 앞으로 소비자들이 인지할 수 있는 수준의 홍보가 진행된다면 백장미 추출물을 함유한 프로테인워터, 아토피 환자용 젤리 제품의 사업화가 가능할 것으로 사료됨.**

7. 고부가가치 와인 개발

가. 고부가가치 와인 개발은 백장미 추출물을 첨가하여 red wine과 white wine을 각각 제조 하여 이를 분석하였음. 발효 결과 pH 와 Brix, gas production의 변화를 비교 하였을 때 백장미 추출물은 첨가한 농도에 관계없이 red wine과 white wine의 발효를 저해 시키지 않았음. 레드 와인에서는 DPPH 라디칼 소거능에서 백장미 추출물의 농도 의존적으로 항산화능이 증가하는 것을 볼 수 있었고 화이트 와인에서는 DPPH, ABTS, total polyphenol 모두 백장미 추출물의 농도 의존적으로 항산화능을 증가시켰음. 이는 이전에 수행된 장미의 phenolic compound 함량에 따른 항산화능 증가 연구 (Nilgün Göktürk Baydar, 2012)와 유의하게 장미의 gallic acid, rosmarinic acid, carnosic acid, quercetin, leteolin, rutin과 같은 phenolics 나 flavanoids에 의해 항산화능이 증가하는 것으로 사료됨.

나. 그 중 gallic acid 는 WRPE의 중요한 phytochemical 로써 특히 화이트 와인의 부족한 항산화능을 증가 시켰으며, *H. pylori* 저해능 실험에서는 white wine이 백장미 추출물의 농도 의존적으로 *H. pylori*를 저해하였는데 이는 백장미 추출물의 antimicrobial activity 효과에 관한 연구(Dongsun Park, 2016)와 유의한 결과를 보였으며 백장미 추출물이 wine 발효 후에도 *H. pylori* 저해능을 보이는 것을 확인하였음. 또한 WRPE를 와인에 첨가하였을 때 관능적 저하를 보이지 않았음.

다. 장미 꽃잎을 첨가한 차(Yakov Vinokur, 2006)의 경우, 장미에서 유래한 이취가 발생하여 기호도가 감소한 것과 비교했을 때, 본 연구의 결과는 장미를 추출하여 첨가 해줌으로써 쓴 맛 증가가 낮았고 이취의 증가를 방지한 것으로 판단됨. 또한 앞 선 연구에서 밝혀졌듯 장미는 건강식품으로 잘 알려진 녹차 보다 높은 항산화력을 지니고 있어 기능성을 높게 향상 시켰다고 할 수 있음.

라. 현재 한국의 와인시장은 증가하고 있으며 이에 따른 소비자의 니즈도 관능적 기호도

가 높은 와인만이 아닌 건강을 고려한 구매로 이어지고 있음. 이를 고려한다면 polyphenol 함량이 낮은 campbell early 품종으로 제조한 레드 와인이나 화이트 와인은 장기적으로 경쟁력이 낮은 품종으로 판단 될 수 있음. 하지만, 본 실험에서 시도하였듯이 높은 항산화 능력과 각종 건강 기능성을 가진 백장미 추출물은 campbell early 포도품종의 단점을 보완할 수 있는 좋은 소재임을 확인하였음. 따라서, 본 연구는 국내 와인 시장의 증가와 더불어 국산 와인의 경쟁력을 증가 시킬 수 있고 기능성 소재를 첨가한 발효식품 연구에도 좋은 예로 이용 될 수 있을 것으로 사료됨.

마. 본 연구과제를 통해 개발된 기술이 사업화와 매출창출로 이어질 수 있도록 향후 와인의 사업화 단계에서 있어 원천기술의 지적재산권 확보, OEM 제조를 통산 생산하고 판매처 및 유통방법의 마련 등 판매 전략의 체계적인 수립에 대한 검토가 필요하다고 사료됨.

제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

1절 목표달성도

1. 연구개발의 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	백장미로부터 피부미용 기능성 성분의 추출 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> 추출효율 증대 방법 및 조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> 추출방법(에탄올 추출, 열수 추출, 고온가압추출, 초임계유체추출, 효소처리 추출) 적용 5건 추출조건 확립 2건(에탄올 추출, 열수 추출) 백장미 추출수율 증대 - 원물대비 수용성 추출물로서 40%(w/w)
		<ul style="list-style-type: none"> 백장미 추출물 기능성분 5개 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 피부미용 기능성분 후보물질 비타민 5종 분석(A, B2, B6, C, E) 및 및 폴리페놀 14종 분석 - 비타민 5종 중 B2, 검출 - 폴리페놀 14종 중 gallic acid, kaempferol, astragalol 3종 검출
	백장미 꽃잎 성분 분리 및 동정	<ul style="list-style-type: none"> 백장미 꽃잎 추출 및 용매 분획 	100	<ul style="list-style-type: none"> 유효성분 분석을 위한 추출물 확보 5종 용매에 대한 분획 실시
		<ul style="list-style-type: none"> Biological activity screening 	100	<ul style="list-style-type: none"> 8개 항목에 대한 생리활성 스크린 및 비교 분석
		<ul style="list-style-type: none"> Active guided fraction 3종 이상 확보 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고효능의 유효물질 함유 분획물 선정 및 성분분석 4종의 2차 fraction 분리 및 성분분석 잠재적 지표물질 확인
	백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발과 장내 미생물의 미치는 영향 및 이를 이용한 고부가가치 와인 개발	<ul style="list-style-type: none"> 고기능성 활성 미생물을 이용한 기능성 성분 강화 기술개발 (분리 균주 2 /미생물 Stock 10) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 선행연구를 통하여 식품소재의 고기능성 phytochemical 생산에 관여한다고 알려진 활성미생물과 그와 관련된 미생물의 확보 - 생물자원 등록 2건 완료
		<ul style="list-style-type: none"> 미생물 활용 대량 탐색기술 확보 및 라이브러리 구축 (in-silico model 분리 2 균주 및 Stock 10 균주 에서 실행) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 미생물 이용 변환에 접목 가능한 활성미생물 활용 대량 탐색기술 확보 및 라이브러리 구축
		<ul style="list-style-type: none"> 미생물을대량 탐색기술을 이용하여 선발 (선택배지를 이용하여 5 균주선발) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 확보된 발효 미생물 라이브에서 분자구조 변환 활성 미생물을 대량탐색기술을 이용하여 선발
	백장미 추출물을 이용한 피부 미용 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 효능평가시스템 구축 	100	<ul style="list-style-type: none"> In vitro/in vivo 주름개선 평가 모델 최적화 및 지표 선정 In vitro/in vivo 미백효능 평가 모델 최적화 및 지표 선정 In vitro/in vivo 보습효능 평가

				<ul style="list-style-type: none"> 모델 최적화 및 지표 선정 ▶ In vitro/in vivo 아토피개선 평가모델 최적화 및 지표 선정
		<ul style="list-style-type: none"> ■ In vitro 효능 확인 	95	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 세포내 콜라겐 생성시험 (collagen synthesis assay) ▶ 세포내 collagenase 억제시험 (collagenase inhibition assay) ▶ Elastase 활성 억제시험 (Elastase inhibition assay) ▶ In vitro tyrosinase 활성 억제시험 ▶ 세포내 melanin 생성 억제효능 확인 ▶ 비만세포 탈과립 억제시험(mast cell degranulation assay)
2차 년도	백장미로부터 피부 미용 기능성 성분 추출공정 최적화 및 대량 생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ■ 백장미 기능성분 추출공정의 최적화 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 반응표면분석법(RSM)연구, 추출조건 3가지 적용, 추출실험 20개 진행, 온도,시간,농도 3가지 최적조건 확보(1차년 수행) ▶ Pilot scale 백장미 에탄올 추출조건3가지 및 열수 추출공정 조건 3가지 적용 확보 ▶ 추출물의 지표성분(gallic acid) 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 추출공정을 통한 백장미 기능성분 대량 생산 기술 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 용매2종(에탄올, 열수)에 대한 Pilot scale의 백장미 추출 기술 개발 ▶ 최종 원물 24 kg 적용 추출 기술 확보 ▶ Lab scale 대비 폴리페놀 추출수율 100 % 이상 확보
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 기능성분 강화를 위한 대량 생산 기술 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 기능성분 강화를 위한 Bioconversion scale-up 기술(50 L 수준) 개발 ▶ Lab scale 대비 전환률 90 % 이상 확보
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 대량생산 기술을 바탕으로 한 기능성 성분의 pilot scale 생산 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 2,000 kg 용량 추출조를 이용한 백장미 에탄올 추출 진행 ▶ 50 L 발효조를 이용한 백장미 추출물 기능성분 강화 Bioconversion 생산화 기술 확립
	백장미 추출물 내 지표물질 선정 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> ■ Activity Guided Isolation 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 액체크로마토그래피를 통한 유효물질의 분리
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 지표물질 선정 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 추출물 내 지표물질의 정량적 검증 ▶ Lead compound로 4가지 물질 확보 ▶ 지표물질 선정을 위한 고 재현성 표준화 방법으로 용매분획4중, TLC, Recycling preparative HPLC 등 7가지 확보
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 구조 동정 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ NMR분석을 통한 구조동정
	백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화	<ul style="list-style-type: none"> ■ 유산균에 의해 발효된 고부가가치백장미 추출물 확보 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Phenolic acid decarboxylase (PAD) 활성을 가질 것으로 예상되는 유산균 균주 10개 선발 ▶ PAD 활성이 높은 <i>Lactobacillus</i>

	기술 개발과 장내 미생물의 미치는 영향 및 이를 이용한 고부가가치 와인 개발			<i>plantarum</i> KCTC 3104 균주를 이용하여 백장미 추출물 주요 성분인 gallic acid를 pyrogallol로 전환
		■ 기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가	100	▶ 26개 균주 라이브리리 이용하여 9개 균주 prebiotics 효과 분석 ▶ Gallic acid에 의하여 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp. 성장 증진 효과 ▶ 백장미 추출물 유래 phytochemical인 gallic acid, pyrogallol의 장내 미생물에 대한 항균 활성 확인
		■ 백장미 추출물의 Prebiotics 효과 분석	100	▶ Gallic acid, pyrogallol, 백장미 추출물이 인체 소화 조건에서 안정성 확인
		■ 대장 시뮬레이션 발효기 모델을 이용한 Prebiotics 효과 분석	100	▶ 확보된 유산균 공시 균주를 이용하여 백장미 추출물의 성장 증진 효과 분석 ▶ 백장미 추출물을 대장 시뮬레이션 발효 모델에 이용하여 발효 이후 장내 미생물 조성 변화와 미생물 변화에 따른 생성된 short chain fatty acid 분석
	백장미 추출물을 이용한 피부 미용 기능성 평가	■ 주름개선효능 검색	100	▶ Hairless mouse 주름개선효능 확인
		■ 보습효능 검색	100	▶ 세포내 및 동물 피부내 ceramide 유지효능 확인
3차 년도	제품화를 위한 공정개발 및 시제품 생산	■ 음료 제품화 공정 개발	100	▶ 음료 영양성분 기준 설정 및 레시피 1건 개발 ▶ 제품 제조 공정 1건 개발 ▶ 소내 관능검사 3회 이상 시행을 통한 제품 개발
		■ 백장미 추출물 함유 두유 생산 공정 개발	100	▶ 음료 영양성분 기준 설정 및 레시피 1건 개발 ▶ 제품 제조 공정 1건 개발 ▶ 소내 관능검사 3회 이상 시행을 통한 제품 개발
		■ 백장미 추출물을 함유한 기능성 식품 시제품 1건 생산	100	▶ 제품 시생산 2건 실시
	기능성 성분을 이용한 고부가가치 와인 개발	■ 기능성 성분을 이용한 와인 제조 및 품질 평가	100	▶ 기능성 성분 이용한 와인 제조 및 품질 평가 기능성 성분 1종 이용하여 와인제조 와인의 일반적 품질 평가 (알콜도수, 기능성 성분 변화, 색도)
		■ 관능평가	100	▶ 관능평가기능성성분을 이용한 와인 일반 시판와인과의 관능 비교 분석 (9점 척도)
	미백 및 아토피 개선 효능 검색	■ 동물모델 미백 효능 검색	100	▶ Brown guinea pig 미백효능 확인 ▶ 논문1건

		<ul style="list-style-type: none"> ■ 동물모델 아토피 개선 효능 검색 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Compound 48/80 유도 전신성 급성 알러지반응 억제효과 ▶ Compound 48/80 유도 국소성 급성 알러지반응 억제효과 ▶ NC/Nga 마우스에서 DNCB 유도 만성 아토피피부염 억제효과
최종 평가		<ul style="list-style-type: none"> ■ 피부미용 기능성 이너뷰티 (Inner Beauty) 신소재 생산기술 개발 및 기능성 음료 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 기능성분 추출기술 최적화 기술 개발 및 대량생산 기술 개발 ▶ 기능성분 함유 제품 4건 개발, 2건 시생산 실시
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 백장미 추출물의 성분 분석 및 분획을 통한 지표물질 선정 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 추출물 성분 분석 ▶ Gallic acid 지표 성분 선정 ▶ 지표성분의 표준화
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 백장미 추출물을 이용한 미생물 기능성 성분 강화 기술 개발과 장내 미생물의 미치는 영향 및 이를 이용한 고부가가치 와인개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104 균주를 이용하여 백장미 추출물 주요 성분인 gallic acid를 pyrogallol로 전환 ▶ 기능성 성분 이용한 와인 제조 및 품질 평가
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 백장미 추출물의 주름개선, 보습, 미백, 아토피 개선 효능 검색 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 주름개선, 보습, 미백, 아토피 개선 효능 검색

2절 관련분야 기여도

기여분야	기여 내용
기술적 측면	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국내외 최초 백장미를 이용한 피부기능성 소재 생산기술 및 제품화 기술 개발 ■ 경제적 소재 생산기술을 통한 기능성 소재의 산업화 기술 개발 ■ 개발 공정 및 조성물에 대한 지적 소유권 확보 및 특허화 ■ 백장미를 이용한 기능성 소재의 추출 기술 확보 ■ 생물전환기술의 산업적 대량생산 적용 기술 개발 ■ 미생물 및 효소 등을 이용하여 기능성 성분을 강화함으로써 백장미 기능성 소재의 고부가 가치화 ■ 장내 기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가 기술 확보 ■ 식물성 유래 생리활성 물질의 분리정제 및 기능성 물질 탐색 기술 ■ 의약품 및 화장품등 다양한 소재로의 기능성 물질 생산기술 ■ 식물유래 천연물 소재의 in vitro, in vivo 기능성 검색기술 ■ 기능성 와인의 개발을 통한 와인의 고부가 가치화 기술

<p>경제/산업적 측면</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국내산 원료를 사용해 피부기능성 소재의 생산 및 기능성 식품을 제조함으로써 해외 수입원료의 대체 효과 ■ 고성장 중인 이너뷰티 소재 및 식품시장 참여를 통한 기업의 매출 창출 및 고용 확대 ■ 지역 유기농 장미 생산품의 특화를 통한 지역경제 활성화 ■ 화훼농업 부산물의 활용 및 부가가치 확대를 통한 농업의 소득 증대 ■ 생화로서의 가치가 떨어져 버려지는 장미 상품을 이용하여 고 기능성의 이너뷰티(Inner Beauty) 소재를 생산함으로써 폐기물 감소와 자원의 재활용 효과 기대 ■ 고기능성 소재의 개발로 식품, 의약품, 화장품으로 사업화를 통한 경제적 파급 효과의 기대 ■ 백장미 유래 피부 기능성 성분 소재를 이용하여 와인을 제조함으로써 수입와인이 주가 된 와인시장에서 새로운 영역 창출 ■ 백장미 유래의 식품에 대한 건강상 이점 증명을 통해 국내 장미 산업에 활성화 기여 ■ 백장미를 활용한 신소재 개발은 제품의 유일성과 희소성 가치를 통해 해외시장 개척 가능 ■ 고부가가치 소재의 개발을 통한 국가의 안정적인 수익 마련의 토대 ■ 피부미용에 고기능성이 있는 백장미에서 소재 생산기술 및 제품화 기술 선점을 통한 국제경쟁력 우위 선점
<p>사회/문화적 측면</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 피부건강에 대한 관심 증가에 따른 피부기능성 이너뷰티(Inner Beauty)식품에 대한 욕구 충족 ■ 피부질환 인구증가로 야기되는 의료비 증가 문제 해결 ■ 고기능성의 백장미 추출물이 포함된 이너뷰티(Inner Beauty) 소재 및 식품을 통한 국민 건강 증진

제5장 연구결과의 활용계획

		코드번호	D-07
분 야	내 용		
핵심기술 활용분야	<ul style="list-style-type: none"> ■ 식물성 기능성 소재의 추출 기술의 응용 및 적용 ■ 화훼유래 생리활성 물질의 분리정제 및 기능성 물질 탐색에 활용 ■ 생물전환기술의 산업적 대량생산 적용 기술 창출 ■ 식물유래 천연물 소재의 기능성 검색기술 활용 		
핵심기술 활용유형 및 산업	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기능성 소재 생산기술 특허 및 식품산업에 적용 ■ 개발 조성물에 대한 지적 소유권 확보 및 특허화 ■ Inner Beauty, Nutraceutical, Cosmoceutical, 의약소재로 적용 		
식품 소재	<ul style="list-style-type: none"> ■ 항균활성을 이용한 식품의 천연소독제 및 방부제 사용 ■ 피부미용 이너뷰티(Inner Beauty) 소재 및 식품으로써 사용 ■ 피부 미용에 도움을 주는 건강 보조식으로 사용 ■ 추출물의 장건강 prebiotics로 사용 		
의약 및 화장품	<ul style="list-style-type: none"> ■ 피부보습을 통한 건조피부 관련 질환의 예방 ■ 항노화, 피부보습, 미백과 같은 기능성 화장품소재로 활용모색 		

제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호 D-08

■ 대장발효기 개발동향

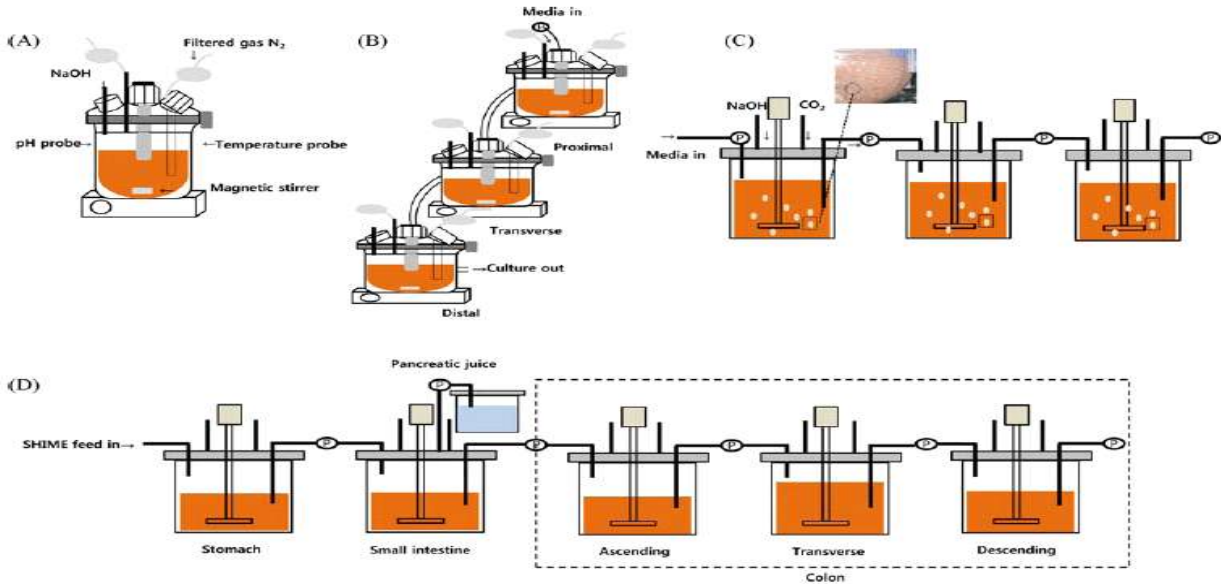


Fig. 2. Different *in vitro* gut models for digestion and/or fermentation. (A) Batch fermentation model used for culture of microorganisms without addition of additional nutrients. (B) Multi-stage chemostat used for simulation of multiple segments of the GI tract, such as the proximal, transverse, and distal colon. (C) Proximal colon reactor containing polysaccharide beads with immobilized fecal microbiota. (D) SHIME model simulation of numerous segments of the GI tract, including the stomach, small intestine, ascending colon, transverse colon, and descending colon.

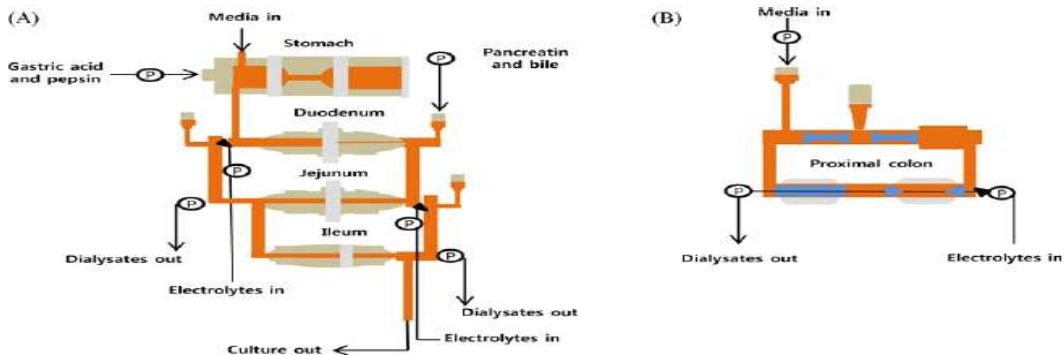


Fig. 3. Different *in vitro* gut models for digestion-fermentation-absorption. (A) TIM-1 model simulation of the upper intestine, including the stomach, duodenum, jejunum, and ileum. The TIM-1 model can also mimic host bile secretion, motility, pH, and absorption abilities of this region of the GI tract. (B) TIM-2 model simulation of the proximal colon. The TIM-2 model mimics host peristaltic mixing, water absorption, and metabolite absorption.

■ 포도주를 포함한 각종 식품원료의 prebiotic효과 연구동향

■ 백장미 꽃잎 추출물의 기능성 평가 연구동향

향균, 향암, 항염증에 효과가 있는 *Rosa spp.* 꽃잎 에탄올 추출물을 이용하여 은나노 입자와 바이오 합성하고 연구 결과를 보고 하였다. 생합성된 은나노 물질은 그램 음성균에 효과적인 항균효과와 활성산소 및 저독성의 특징을 보였다.

장미 폴리페놀은 체내 혈당의 급격한 상승을 억제한다는 연구 결과를 보고하였다. 식후 혈당 상승을 조절하고 혈당 및 인슐린을 낮은 수준으로 유지시켜 주었다. 또한 장미 폴리페놀이 트리글리세라이드를 글리세롤과 지방산으로 분해하는 지방 분해 효소를 억제함으로써 당 섭취로부터 체내 지방 생산을 억제하였음.

Table 3. Studies using *in vitro* fermentation models¹⁾

Food components	Type of study	Duration	Dose	Microbial techniques	Population increase	Population decrease	Refs
Oligosaccharides							
Fructo-oligosaccharides	Batch	48 h	0.3 g/100 mL	qPCR	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	(13)
Galacto-oligosaccharides	Three-stage continuous	3 weeks	2x daily (4.0 g)	qPCR	<i>Lactobacillus</i> spp.		(8)
Xylo-oligosaccharides	Batch	24 h	0.5 g/50 mL	FISH	<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	(53)
Isomalto-oligosaccharides	Batch	24 h	0.5 g/50 mL	FISH	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	(53)
Arabino-oligosaccharides	Batch	24 h	1.0 g/100 mL	qPCR	<i>Bifidobacterium</i> spp.		(44)
Fucosyllactose	Batch	48 h	5.0 g/L	qPCR	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> <i>C. perfringens</i>	(6)
Sialyllactose	Batch	24 h	1.0 g/ 100 mL	qPCR	<i>Bifidobacterium</i> spp.		(52)
Polysaccharides							
Inulin	TIM-2	2 weeks	3.0 g/day	Intestinal-Chip Plate count PCR-DGGE	<i>B. adolescentis</i>		(5)
Dextran	Batch		1.0 g/100 mL	FISH	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	(4)
Phytochemicals or polyphenols							
Gallic acid	Batch	24h	1 mg/mL	FISH	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	(54)
Complex food extracts							
Soy germ powder	SHIME	2 weeks	2.5 g/day	Plate count	Enterobacteriaceae Coliforms <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp.		(46)
Black tea extract	Twin-SHIME	2 weeks	3x daily (1,000 mg)	Plate count qPCR PCR-DGGE pyrosequencing	<i>Klebsiella</i> spp. Enterococci <i>Akkermansia</i> spp.	<i>Bac. coccoides</i> <i>Anaeroglobus</i> spp.	(47)
Red wine-grape juice	Twin-SHIME	2 weeks	3x daily (1,000 mg)	Plate count qPCR PCR-DGGE pyrosequencing	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Alistipes</i> spp. <i>Cloacibacillus</i> spp. <i>Victivallis</i> spp. <i>Akkermansia</i> spp.	<i>Bac. coccoides</i> <i>Anaeroglobus</i> spp.	(47)

¹⁾Fermentation conditions for type of study, food components, duration, and dosage, and microbial techniques used, and main effects on bacteria groups, such as population increase and decrease, are included.

제7장 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	D-09
보안등급분류	일반과제		
결정사유	“ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음”		

제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

	코드번호	D-10
○ 해당사항 없음		

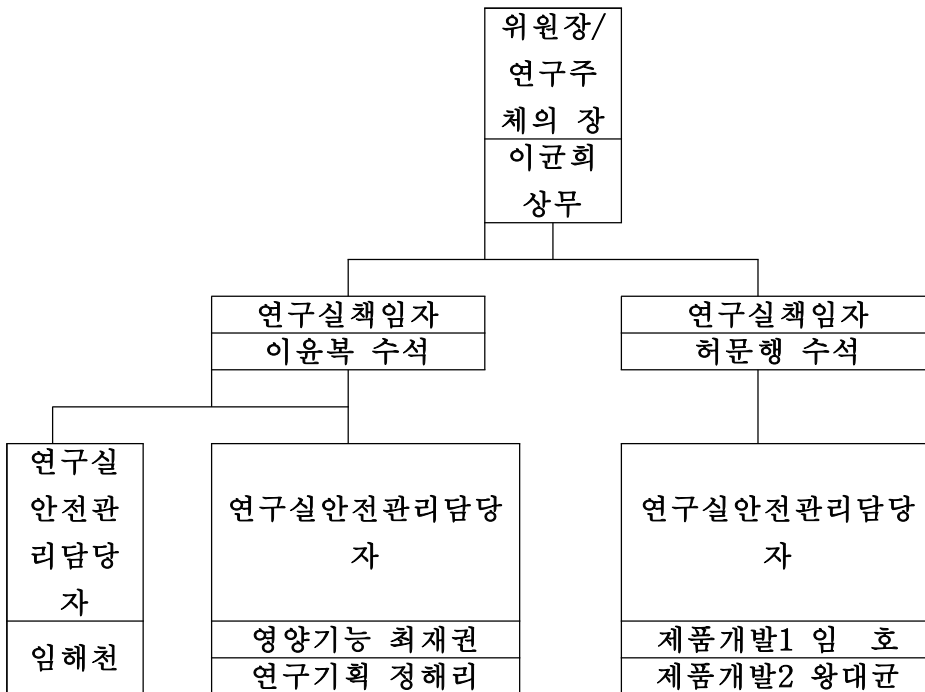
제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호 D-11

1절 주관연구기관(정식품)

1. 안전관리조직체계 및 직무 수립
2. 연구실별 안전관리담당자의 지정 및 그 책임과 권한의 부여

연구소 안전관리위원회 조직도



3. 주기적 안전교육의 실시
4. 연구실 안전표식의 설치 또는 부착
 - 가. 실험실 내 보호구함 구비 및 안전보호구 착용
 - 나. MSDS 부착/ 화학물질에 따른 보관위치 준수
 - 다. 안전장치 정상 작동 상태 확인/ 안전표지 점검 및 부착
5. 안전진단 실시
 - 가. 일상점검 : 연구개발활동을 시작하기 전·후에 매일 1회 실시
 - 나. 정밀안전진단 : 법 제10조의2에 의거 등록된 정밀안전진단 대행기관을 통하여 2년
마다 1회 이상 정밀안전진단을 실시

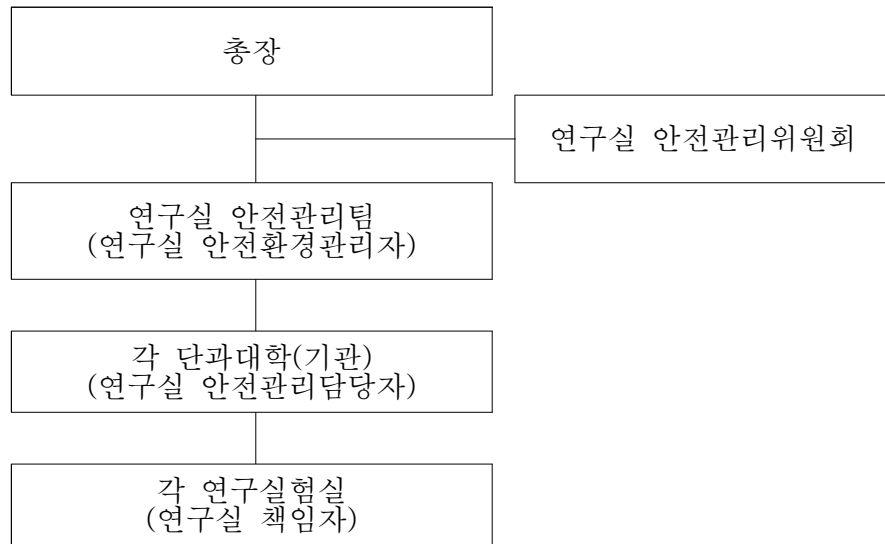
안전진단	2014 정밀안전진단	2015년 연구실 안전관 리 현장점검	2016 정밀안전진단
실시일자	2014.10.13	2015.11.27	2016.7.22
점검기관	(사)대한산업안전협회	국가연구안전관리본부	(사)대한산업안전협회

6. 연구실사고 발생 시 긴급대처방안과 행동요령 수립
7. 사고조사 및 후속대책 수립

2절 제1.2협동기관(충북대 식품공학과, 충북대 수의학과)

1. 안전관리조직체계 및 직무 수립
2. 연구실별 안전관리담당자의 지정 및 그 책임과 권한의 부여

연구실 안전관리 전담 조직 구성



3. 연구실 안전관리 현황
 - 가. 실태조사 실시

구분	목적	조사주기	비고
실태조사	· 대학 연구실 안전관리 현황 조사 · 개별연구실 안전관리 실태조사	2년 1회	교육과학기술부
	· 정기점검 및 정밀안전진단 대상 연구실 조사	연 1회	연구실 안전관리팀

※ 정기점검 대상 : 가스·화학약품·유해물질·방사성 동위원소 사용, 실험폐기물 배출, 생물 및 동물 실험, 기계장비가 설치된 연구실

※ 정밀안전진단 대상 : 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

※ 점검 및 진단 제외 : 이화학 연구실이 아닌 컴퓨터실, 공부방, 동아리방, 세미나실 등

- 나. 안전점검 실시

구분	점검대상	점검자	점검주기	점검방식	비고
일상점검	이화학 연구실 전체	연구활동종사자	매일 1회	일상점검표 (온라인 병행)	연구실별 실시
정기점검	정기점검 대상 연구실	안전점검 전문기관	연 1회	점검장비 및 점검표	연구실 안전관리팀
주간점검	방사선 기기 보유 연구실	방사선 안전관리자	매주 1회	점검장비 및 점검표	연구실 안전관리팀

다. 정밀안전진단 실시

구분	진단대상	점검자	점검주기	점검방식	비고
정밀안전진단	관련법에서 정한 유해화학물질·유해인자·독성가스를 취급하는 연구실	정밀안전진단 전문기관	2년 1회	진 단 장 비 및 점검표	연구실 안전관리팀

라. 안전교육·훈련 실시

구분	교육대상	교육자	교육시기	교육시간	비고
정기교육	연구활동종사자 (교원 포함)	대학(기관), 각실 연구실책임자, 연구실안전환경관리자	실험시작전 또는 수시	반기별 6시간이상	대학(기관) 및 연구실별 실시
특별교육	대학원생, 연구원, 조교 등	연구실안전환경관리자, 전문강사	연1회	2시간 (집합교육)	연구실 안전관리팀
	신규 채용 등에 따른 교육·훈련(대학생·대학원생 등)	연구실안전환경관리자, 전문강사	연2회	2시간(회당) (집합교육)	연구실 안전관리팀
	연구실안전관리시스템 사용자	시스템 관리자	연2회	1시간(회당) (집합교육)	연구실 안전관리팀
방사선 안전교육	신규 방사선작업종사자	방사선 안전관리자	연2회	20시간이상 (집합교육)	연구실 안전관리팀
	기존 방사선작업종사자	방사선 안전관리자	연2회	6시간이상 (집합교육)	연구실 안전관리팀

※ 연구활동종사자 : 과학기술분야 모든 교원, 학부생, 대학원생, 연구(보조)원 등

※ 신규 채용된 연구활동종사자(계약직 포함) : 해당기관에서 자체 또는 외부 전문기관에 의뢰하여 위탁교육을 실시하여야 함(8시간 이상).

마. 건강검진 실시

구분	검진대상	검진기관	검진주기	비고
건강검진	인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자	특수건강진단기관	연 1회	연구실 안전관리팀

※ 단, 아래 항목에 해당하는 경우에 한하여 연구활동을 시작하기 전에 자체적으로 배치전 건강검진을 실시하여야 함.

- (1) Biosafety Level 2* 이상의 생물학적 유해인자를 다루는 연구활동인 경우
- (2) 연구활동종사자가 노출될 경우 변이원성, 생식독성, 발암성, 호흡독성 등의 독성을 일으킬 우려가 있는 화학물질을 다루는 연구활동의 경우
- (3) 특정 물질을 취급할 때 악화될 수 있는 의학적 소견을 보이는 연구활동종사자의 경우

바. 보험 가입 현황

보험명	보상내용(한도)	대상	주관부서
건물 및 물품* 보험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 건물 <ul style="list-style-type: none"> - 화재(벼락), 폭발, 붕괴, 태풍, 홍수, 호우, 강풍, 풍랑, 해일, 대설 그 밖에 이와 유사한 사고로 인한 피해 ▶ 신체손해 <ul style="list-style-type: none"> - 공제가입한 교육연구시설의 화재(벼락), 폭발, 붕괴, 태풍, 홍수, 호우, 강풍, 풍랑, 해일, 대설로 인한 신체손해 - 사망/후유장애 : 호프만계수에 의해 산출한 실손해액 지급 - 부상 : 치료실비 	건물 및 신체손해 대상자	경리과
학교경영자배상 책임보험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 신입생 상해손해 : 1인당 사망·후유장애 1억/의료비 5백만원 (보험기간 관계없이 O/T 기간내 보상) ▶ 대인배상 : 1인당 1억/1사고당 30억(자기부담금100,000원) ▶ 대물배상 : 1사고당 3천만원(자기부담금100,000원) ▶ 구내·외 치료비 : 1인당 5백만원/1사고당 5백만원(자기부담금 없음) 	신입생 및 재학생	학생처
교직원 단체보험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 생명/상해 보장보험 : 1인당 5천만원 ▶ 의료비 보장보험 : 1인당 1천만원 	교직원 (공무원 및 기성회직)	총무과
연구실 안전공제 보험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 사망/후유장애 : 1인당 1억원 ▶ 상해 : 1인당 1천만원 	연구활동 종사자	연구실 안전관리팀

※ 연구실 안전공제 보험의 연구활동종사자란?

- (1) 과학기술분야 학부생, 대학원생, 수료 후 등록생 : 자동 가입
- (2) 교원 : 가입 대상 아님
- (3) 연구(보조)원 : 가입 대상(4대 보험 가입자는 제외)
- (4) 그 외의 연구활동종사자 : 가입 대상

단, (3)과 (4)에 해당하는 가입 대상자는 산학협력단에 가입을 요청하여야 함.


4. 기타 안전관리 사항

구분	내용	비고
1) 연구실 안전관리규정	충북대학교 연구실 안전관리규정 비치	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr) 참조
2) 화학약품 관리	연구실별 보유 화학약품 등록 및 폐기 관리	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr) 참조
3) MSDS 관리	연구실별 보유 화학약품의 MSDS 비치	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr) 참조
4) 실험폐기물 관리	실험폐기물처리 준수사항 이행 및 위탁 처리 관리	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr) 참조
5) 안전시설 점검 및 보수	비상샤워기, 세안기 등 작동 점검 및 보수	연구실 안전관리팀
6) 연구실험실 배치도 관리	주요 연구실험실 배치도 작성 관리	연구실 안전관리팀
7) 연구실험실 유해물질 관리	유해물질농도 측정	연구실 안전관리팀
8) 연구실험실 환기 등 연구환경 개선	연구실험실 환기 등 연구환경 개선공사 시행	
9) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	위험성이 큰 실험실에 별도의 특수소화설비를 설치하여 사고 확산을 예방	
10) 유기용매 보관시설 설치 등 및 액체질소 통합관리	1. 보관창고를 설치하여 통합관리 2. 액체질소를 통합관리	
11) 연구실험실 안전관리수칙 작성	연구실험실 안전수칙 보완 설치	
12) 가스 안전관리	고압가스용기 설치시 가스누설경보기, 전도방지장치 등 가스안전시설 설치	
13) 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치	
14) 개인보호구 지급	개인보호구 지급	
15) 연구실험실 출입자 관리	연구실험실별 출입자 관리	
16) 기타	기타 안전관리사항	

제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

코드번호 D-12

1절 특허/산업재산권 실적


출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2014	신규한 스타터 균주 및 이를 이용한 사위도우	충북대학교 산학협력단	한국	10-2014-0055660
2015	백장미 추출물의 제조방법	(주)정식품	한국	10-2015-0133475
공개특허 10-2015-0128365				
 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)		(11) 공개번호 10-2015-0128365 (43) 공개일자 2015년11월18일		
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) A21D 8/04 (2006.01) C12R 1/24 (2006.01)		(71) 출원인 충북대학교 산학협력단 충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)		
(21) 출원번호 10-2014-0055660 (22) 출원일자 2014년05월09일 심사청구일자 2014년05월09일 기술이전 회당 : 기술양도, 실사권허여, 기술지도		(72) 발명자 한남수		
		(74) 대리인 위병갑		
전체 청구항 수 : 총 7 항		관인생략 출원번호통지서 출원일자 2015.09.22 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2015-0133475 (접수번호 1-1-2015-0920628-07) 출원인명칭 주식회사 정식품(1-1998-003420-1) 대리인성명 특허법인태통(9-2008-100001-5) 발명자성명 정성수 이순구 이근희 이윤복 최재권 임해전 발명인명칭 백장미 추출물의 제조방법		

2절 논문실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Garlic is a source of major lactic acid bacteria for early-stage fermentation of cabbage-Kimchi	충북대 식품공학과	주저자(제1저자, 교신저자)	Food Science and Biotechnology	0.699	2015.08.31	중복사사	SCI
2	논문	Isolation and characterization of human intestinal Enterococcus avium EFEL009 converting rutin to quercetin	충북대 식품공학과	주저자(제1저자, 교신저자)	Journal of Applied Microbiology	1.629	2016.01	단독사사	SCI
3	논문	Development of Bile Salt-Resistant Leuconostoc citreum by Expression of Bile Salt Hydrolase Gene	충북대 식품공학과	주저자(제1저자, 교신저자)	Journal of Microbiology and Biotechnology	1.399	2015.12.25	중복사사	SCI
4	논문	Genome sequence analysis of potential probiotic strain	충북대 식품공학과	주저자(제1저자)	Journal of Microbiology	1.621	2015.05	중복사사	SCI

		<i>Leuconostoc lactis</i> EFEL005 isolated from kimchi		교신저자)					
5	논문	Application of In Vitro Gut Fermentation Models to Food Components: A Review	충북대 식품공학과	주저자(제1저자, 교신저자)	Food Science and Biotechnology	0.699	2016.03.30	중복사사	SCIE
6	논문	<i>In vitro</i> digestion and fermentation of sialyllactoses by infant gut microflora	충북대 식품공학과	주저자(제1저자, 교신저자)	Journal of Functional Foods	3.973	2016.01.21	중복사사	SCIE
7	논문	Extraction conditions of white rose petals for the inhibition of enzyme related to skin aging	충북대 수의대	제2협동	Lab. Anim. Res.		2015.09.30	단독사사	연구재단 등재지
8	논문	Antimicrobial activities of ethanol and butanol fractions of white rose petal extract	충북대 수의대	제2협동	Regul. Toxicol. pharmacol.	2.227	2016.01.21	단독사사	SCI
9	논문	Effectiveness of the combinational treatment of <i>Laminaria japonica</i> and <i>Cistanche tubulosa</i> extracts in hair growth	충북대 수의대	주저자(제1저자, 교신저자)	Laboratory animal research		2015.03.09	중복사사	비SCI
10	논문	A Dunning Compound MB12662 Improves Cisplatin-Induced Tissue Injury and Emesis	충북대 수의대	주저자(제1저자, 교신저자)	Biomolecules therapeutics	0.794	2015.05.15	단독사사	SCI
11	논문	Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in human oligodendrocyte progenitor cells and restoration of motor function in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy.	충북대 수의대	주저자(제1저자, 교신저자)	Evidence-based Complementary and Alternative Medicine	2.175	2015.03.16	중복사사	SCI
12	논문	Comparative analysis of anti- <i>Helicobacter pylori</i> activities of FEMY-R7 composed of <i>Laminaria japonica</i> and <i>Oenothera biennis</i> extracts in mice and humans	충북대 수의대	주저자(공동주저자, 교신저자)	Laboratory animal research		2015.03.31	단독사사	비SCI
13	논문	The anti-aging	강릉원주	주저자(BMC	2.02	2015.10.05	단독사사	SCI

		properties of a human placental hydrolysate combined with dieckol isolated from <i>Ecklonia cava</i>	대	공동주저자, 교신저자	complementary and alternative medicine				
14	논문	Soy milk digestion extract inhibits progression of prostate cancer cell growth via regulation of prostate cancer-specific antigen and cell cycle-regulatory genes in human LNCaP cancer cells	(주)정식품	주저자(제1저자, 교신저자)	MOLECULAR MEDICINE REPORTS	1.559	2016.04.02	중복사사	SCI
15	논문	Extraction Conditions for Phenolic Compounds with Antioxidant Activities from White Rose Petals	(주)정식품	주저자(제1저자, 교신저자)	Journal of applied biological chemistry		2015.06.30	단독사사	비SCI

Letters in Applied Microbiology 

Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254


ORIGINAL ARTICLE

Isolation and characterization of human intestinal *Enterococcus avium* EFEL009 converting rutin to quercetin


N.R. Shin^{1*}, J.S. Moon^{1*}, S.-Y. Shin¹, L. Li¹, Y.B. Lee², T.-J. Kim¹ and N.S. Han¹

¹ Division of Animal, Horticultural, and Food Sciences, Brain Korea 21 Center for Bio-Resource Development, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
² Central Research Institute, Dr. Chung's Food Co. Ltd., Cheongju, Korea

ISSN 1738-6055 (Print)
ISSN 2233-7660 (Online)

 Lab Anim Res 2015; 31(3), 148-152
http://dx.doi.org/10.5625/lar.2015.31.3.148

Letter




Extraction conditions of white rose petals for the inhibition of enzymes related to skin aging

Ehn-Kyoung Choi^{1*}, Haiyu Guo^{1*}, Jae-Kwon Choi², Su-Kil Jang¹, Kyungha Shin¹, Ye-Seul Cha¹, Youngjin Choi¹, Da-Woom Seo¹, Yoon-Bok Lee³, Seong-Soo Joo^{3*}, Yun-Bae Kim^{3*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
²Central Research Institute, Dr. Chung's Food Co. Ltd., Cheongju, Korea
³Department of Marine Molecular Biotechnology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Korea

Regulatory Toxicology and Pharmacology 76 (2016) 57-62

Contents lists available at ScienceDirect

 Regulatory Toxicology and Pharmacology 


journal homepage: www.elsevier.com/locate/yrtph

Antimicrobial activities of ethanol and butanol fractions of white rose petal extract

Dongsun Park^{2,1}, Kyungha Shin^{2,1}, Youngjin Choi², Haiyu Guo², Yeseul Cha², Sa-Hyun Kim², Nam Soo Han², Seong Soo Joo², Jae Kwon Choi², Yoon Bok Lee², Ehn-Kyoung Choi², Jong Bae Kim¹, Yun-Bae Kim^{2,3*}

¹ College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, South Korea
² Department of Biomedical Laboratory Sciences, Semyung University, Jecheon, South Korea
³ Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, South Korea
⁴ Department of Marine Molecular Biotechnology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea
⁵ Central Research Institute, Dr. Chung's Food Co. Ltd., Cheongju, South Korea
⁶ Department of Biomedical Laboratory Sciences, Yonsei University, Wonju, South Korea

Jang et al. BMC Complementary and Alternative Medicine (2015) 15:345
DOI 10.1186/s12906-015-0876-0

 BMC Complementary & Alternative Medicine


RESEARCH ARTICLE Open Access



The anti-aging properties of a human placental hydrolysate combined with dieckol isolated from *Ecklonia cava*

Su Kil Jang^{1†}, Do Ik Lee^{2†}, Seung Tae Kim¹, Gwang Hoon Kim¹, Da Woon Park¹, Jung Youl Park², Daehee Han¹, Jae Kwon Choi¹, Yoon-bok Lee³, Nam-Soo Han³, Yun Bae Kim³, Jeongsu Han⁴ and Seong Soo Joo^{5*}

J Appl Biol Chem (2015) 58(2), 117-124
http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2015.021

 Online ISSN 2234-7941
Print ISSN 1976-0442

Original Article: Biochemistry/Molecular Biology

Extraction Conditions for Phenolic Compounds with Antioxidant Activities from White Rose Petals

Jae Kwon Choi · Yoon Bok Lee* · Kyun Hee Lee · Hae Cheon Im · Yun Bae Kim · Ehn Kyoung Choi · Seong Soo Joo · Su Kil Jang · Nam Soo Han · Chung Ho Kim

Received: 21 December 2014 / Accepted: February 5 2015 / Published Online: 30 June 2015
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

3절 학술대회발표 실적

발표연도	발표주제	과제책임자	학회명	국내외 구분
2013	Prebiotic or inhibitory effects of phytochemicals on human intestinal microbiota	한남수	일본생물공학회	국외
2013	Stimulatory or inhibitory effects of 6 phytochemicals on human intestinal microbiota	한남수	한국식품과학회	국내
2013	Isolation and identification of strains converting rutin to quercetin from human intestinal microorganism	한남수	한국식품과학회	국내
2013	Development of Novel Prebiotics for Synbiotic Use	한남수	한국유산균학회	국내
2014	Optimization of Extraction Conditions of Antioxidative Compounds from white rosa spp. using Response Surface Methodology	이윤복	한국생물공학회	국내
2013	White Rose petal fractions effectively inhibit the production of melanin in B16F10melanoma cell line	주성수	International conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology	국제
2015	Effectiveness of the combinational treatment of laminaria japonica and cistanche tubulosa extracts in hair growth	김윤배	2015 한국실험동물학회 국제학술대회	국제
2015	Improvement of alcoholic gastric ulcers by broccoli sprout extract in rats	김윤배	2015 성봉수의학술제	국내
2015	Effectiveness of the combinational treatment of F3.KGF, IL-10 and PRP in hair growth	김윤배	2015 성봉수의학술제	국내
2015	Neuroprotective Effect of Nattokinase Mediated by Inhibition of Platelet Aggregation and Thrombosis in Photothrombotic Stroke	김윤배	2015 international STROKE conference	국제
2015	Effectiveness of the combinational treatment of laminaria japonica and cistanche tubulosa extracts in hair growth	김윤배	2015 대한수의학회 추계국제학술대회	국제
2015	In vitro fermentation of white rose extract by the human intestinal microbiota	한남수	International Conference on Food Factors ICOFF 2015	국제

2015	Bioconversion of ginsenoside Rb1 and Rd into compound K through the use of beta-glucosidase from <i>Flavobacterium johnsoniae</i> KACC 11414 expressed in Lac	한남수	International Conference on Food Factors ICOFF 2015	국제
2015	in vitro digestion and fermentation properties of fucosyllactoses by infant gut microbiota	한남수	International Conference on Food Factors ICOFF 2015	국제
2015	Prebiotic effect of arabino-oligosaccharides	한남수	International Conference on Food Factors ICOFF 2015	국제
2016	Copper oxide nanoparticles induces fibrotic response via TGF- β / Smad signaling	김윤배	한국실험동물학회	국내
2016	Inhibition of harmful microorganisms and dermal enzymes related to skin aging by white rose petal extract	김윤배	한국실험동물학회	국내
2016	Skin whitening and anti-wrinkle activities of white rose petal extracts	김윤배	한국실험동물학회 국제학술대회	국제
2016	Biotechnological Application of Lactic Acid Bacteria to Produce Bioactive Compounds	한남수	International conference on beneficial microbes 2016	국제
2016	Biomass Composition of <i>leuconostoc mesenteriodes</i> ATCC 8293	한남수	KMB2016 43rd annual meeting&international symposium	국제
2016	Skin Whitening and anti-wrinkle activities of white rose petal extracts	김윤배	2016 KALAS International Symposium	국제

4절 수상 실적

수상연도	수상명	수상내용	수여기관	과제책임자
2015	우수포스터상	(사) 한국실험동물학회, 우수포스터상	(사) 한국실험동물학회	김윤배
2015	LAR 다수 논문 게재상	(사) 한국실험동물학회, LAR 다수 논문 게재상	(사) 한국실험동물학회,	김윤배
2016	우수포스터 발표상	한국응용생명화학학회 2016년도 국제 학술대회 우수 포스터상	한국응용생명화학학회	김윤배

5절 홍보 실적

홍보일	홍보유형	매체명	홍보내용	과제책임자
2016	신문기사	충북일보 등 12개 일간지	백장미 꽃잎 추출물의 아토피 피부염에 대한 기능성 홍보	김윤배

2016	지방TV방송	CJB	CJB8시 뉴스 방송을 통하여 백장미 꽃잎 추출물의 아토피 피부염 증상 완화 기능성 홍보	김윤배
2016	사보기사	(주)정식품 사보 웹진	백장미 꽃잎 추출물의 피부기능성 연구결과 홍보	이윤복

6절 인력 양성

인력양성 년도	인력양성명	인력양성내용	과제 책임자
2015	박사학위취득	기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가 연구진행	한남수
2015	석사학위취득	기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가 연구진행	한남수
2015	석사학위취득	기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가 연구진행	한남수
2015	석사학위취득	기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가 연구진행	한남수
2015	석사학위취득	백장미 추출물의 성분 동정 및 지표물질 설정 연구	주성수
2015	박사학위취득	기능성 성분이 장내 미생물에 미치는 영향 평가 연구진행	한남수
2016	학사학위취득	학사학위 취득	김윤배
2016	학사학위취득	학사학위 취득	김윤배

제11장 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

제12장 참고문헌

코드번호	D-14
○Kyuhoo Lee, Jinlin Zhao, and Jae-Youn Ko. 2005. EXPLORING THE KOREAN WINE MARKET. Journal of Hospitality & Tourism Research, Vol. 29,pp. 20-41	
○BARRY D. GEHM, JOANNE M. MCANDREWS, PEI-YU CHIEN, AND J. LARRY JAMESON. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 14138 - 14143.	
○Günter Schamel. 2006. Geography Versus Brands in a Global Wine Market. Wiley InterScience Agribusiness, Vol. 22, No.pp.3363 - 374 .	
○Cheol Yook, Myeong-Hyeon, Dong-Ho Kim, and Jae-Sik Kim. 2007. Quality Improvement of Campbell Early Wine by Mixing with Different Fruits. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL, Vol. 39, NO. 4, pp. 390-399	
○T.J. VanderJagt, R. Ghattas, D.J VanderJagt, M. Crossey, R.H Glewa. 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico, Life Sciences 70,pp. 1035 - 1040	
○Baydar NG and Baydar H, 2013, Phenolic Compounds, Antiradical Activity and Antioxidant Capacity of Oil-Bearing Rose (Rosa Damascena Mill.) Extracts. Ind Crops Prod 41, pp 375 - 80.	
○Huang Z, Wang B, Eaves DH, Shikany JM, and Pace RD. 2007. Phenolic Compound Profile of Selected Vegetables Frequently Consumed by African Americans in the Southeast United States. Food Chem 103(4), pp. 1395 - 402.	
○Ulusoy S, Boğgelmez-Týnaz G, and Seçilmiş-Canbay H. 2009. Tocopherol, Carotene, Phenolic Contents and Antibacterial Properties of Rose Essential Oil, Hydrosol and Absolute. Curr Microbio 59 (5), pp.554 - 8.	
○Vinokur Y, Rodov V, Reznick N, Goldman G, Horev B, Umiel N et al. 2006. Rose Petal Tea as an Antioxidant-rich Beverage: Cultivar Effects. J Food Sci Educ 71(1), pp. 42 - 7.	
○Zheng W and Wang SY. 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. J Agric Food Chem 49(11),pp. 5165 - 70.	
○Jae Kwon Choi · Yoon Bok Lee* · Kyun Hee Lee et al. 2015. Extraction Conditions for Phenolic Compounds with Antioxidant Activities from White Rose Petals. J Appl Biol Chem 58(2), pp. 117-124	
○Yoo, Ki-Seon ¹ , Ji Eun Ahn ¹ , Jin Soo Han, Eunyoung Seo ¹ et al. 2005. Antimicrobial Treatment of Grapes Using Sodium Hypochlorite in Winemaking and Its Effects on the Chemical and Sensory Characteristics of Wines. J. Microbiol. Biotechnol. 21(12), pp. 1243 - 1249	
○TOMOYUKI IWAHI, HIROSHI SATOH, MASAFUMI NAKAO et al.1991. Lansoprazole, a Novel Benzimidazole Proton Pump Inhibitor, and Its Related Compounds Have Selective Activity against Helicobacter pylori. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, pp. 490-496	

- Al-Mustafa AH and Al-Thunibat OY (2008) Antioxidant Activity of Some Jordanian Medicinal Plants Used Traditionally for Treatment of Diabetes. *Pak J Biol Sci* 11(3), 351 - 8.
- Bajpai M, Pande A, Tewari SK, and Prakash D (2005) Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Some Food and Medicinal Plants. *Int J Food Sci Nutr* 56(4), 287 - 91.
- Baydar NG and Baydar H (2013) Phenolic Compounds, Antiradical Activity and Antioxidant Capacity of Oil-Bearing Rose (*Rosa Damascena* Mill.) Extracts. *Ind Crops Prod* 41, 375 - 80.
- Boskabady MH, Shafei MN, Saberi Z, and Amini S (2011) Pharmacological Effects of *Rosa Damascena*. *Iran J Basic Med Sci* 14(4), 295 - 307.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, and Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss u Technol* 28(1), 25 - 30.
- Cai YH, Luo Q, Sun M, and Corke H (2004) Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sci* 74(17), 2157 - 84.
- Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, and Corke H (2006) Structure - radical Scavenging Activity Relationships of Phenolic Compounds from Traditional Chinese Medicinal Plants. *Life Sci* 78(25), 2872 - 88.
- Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, and Larondelle Y (2007) Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua tubers. *Separation and Purification Technology* 55, 217 - 25.
- Cowan MM (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 12(4), 564 - 82.
- Fernandes de Oliveira AM, Pinheiro LS, Souto Pereira CK, Neves Matias W, Albuquerque Gomes R, Souza Chaves O et al. (2012) Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Malvaceae Family Species. *Antioxidants* 1(1), 33 - 43.
- Huang Z, Wang B, Eaves DH, Shikany JM, and Pace RD (2007) Phenolic Compound Profile of Selected Vegetables Frequently Consumed by African Americans in the Southeast United States. *Food Chem* 103(4), 1395 - 402.
- Juntachote T, Berghofer E, Bauer F, and Siebenhandl S (2006) The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 121 - 33.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS et al. (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem* 47(10), 3954 - 62.
- Kim DI and Hong JH (2012) Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. *Korean J Food Cookery Sci* 28(3), 275 - 83.
- Koh YJ, Cha DS, Choi HD, Park YK, and Choi IW (2008) Hot Water Extraction Optimization of Dandelion Leaves to Increase Antioxidant Activity. *Korean J Food Sci Biotechnol* 40(3), 283 - 9